

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042291**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.01.31**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201890383**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.08.01**

---

(54) **КОНСТРУКЦИИ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С  
МЕЗОТЕЛИНОМ И КДЗ (CD3)**

---

(31) **62/199,939; 62/290,861**

(56) **WO-A2-2014004549  
WO-A1-2010124797  
WO-A2-2008119567  
WO-A2-2008143954  
WO-A1-2016016859**

(32) **2015.07.31; 2016.02.03**

(33) **US**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/EP2016/068304**

(87) **WO 2017/021356 2017.02.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЭМДЖЕН РИСЕРЧ (МЮНИК) ГМБХ  
(DE); ЭМДЖЕН ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Раум Тобиас, Куфер Петер, Рау Дорис,  
Анлар Йонас, Блюмель Клаудиа,  
Хоффманн Патрик, Нарвольд  
Элизабет (DE), Бейлис Джули (US),  
Мюнц Маркус, Брозни Йоханнес,  
Фридрих Маттиас, Ратгель Бенно,  
Богнер Памела, Вольф Андреас,  
Помпе Корнелиус (DE)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Данное изобретение относится к конструкции биспецифического антитела, содержащей первый связывающий домен, который связывается с мезотелином (MSLN) человека на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с КДЗ (CD3) человека на поверхности Т-клетки. Кроме того, в изобретении предложен полинуклеотид, кодирующий конструкцию антитела, вектор, содержащий указанный полинуклеотид, и клетка-хозяин, трансформированная или трансфектированная указанным полинуклеотидом или вектором. Дополнительно в изобретении предложен способ получения конструкции антитела по изобретению, медицинское применение указанной конструкции антитела и набор, содержащий указанную конструкцию антитела.

---

**042291**  
**B1**

**042291**  
**B1**

Данное изобретение относится к конструкции биспецифического антитела, содержащей первый связывающий домен, который связывается с МЗЛН (MSLN) человека на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с кластером дифференцировки 3, КД3 (CD3) человека на поверхности Т-клетки. Кроме того, в изобретении предложен полинуклеотид, кодирующий конструкцию антитела, вектор, содержащий указанный полинуклеотид, и клетка-хозяин, трансформированная или трансфектированная указанным полинуклеотидом или вектором. Кроме того, в изобретении предложен способ получения конструкции антитела по изобретению, медицинское применение указанной конструкции антитела и набор, содержащий указанную конструкцию антитела.

### Введение

Мезотелин представляет собой белок клеточной поверхности, который первоначально был обнаружен как антиген, распознаваемый К1, моноклональным антителом, полученным иммунизацией мышей с клеточной линией рака яичника человека OVCAR-3 (Chang et al., Int. J. Cancer 1992). Для идентификации кДНК мезотелина из библиотеки HeLa применяли экспрессионное клонирование (Chang et al., PNAS 1996). Молекулярный анализ показал, что ген мезотелина кодируется в пределах белка-прекурсора размером 69 кДа, который расщепляется фурином с образованием двух разных белков: потенцирующего фактора мегакариоцитов, ПФМ (MPF), белка размером 31 кДа, который выбрасывается, и мезотелина, белка размером 40 кДа, который ассоциируется с клеточной мембраной через гликофосфатидилинозитоловую связь (якорь GPI) (Chang et al., PNAS, 1996). Белок мезотелина организован в виде суперспиральных доменов с повторами по типу армадила (броненосца), АРМ (ARM).

Мезотелин экспрессируется с высокими уровнями при раке яичника, а также в других видах опухолей, включая рак поджелудочной железы, мезотелиому, рак легких, рак желудка и тройной отрицательный рак молочной железы. В нормальных тканях мезотелин в основном экспрессируется в слое мезотелиальных клеток плевральной, перикардальной и брюшной полостей. Кроме того, мезотелин экспрессируется на поверхности эпителия нормального яичника, фаллопиевой трубы и миндаины.

В дополнение к экспрессии на клеточной поверхности мезотелин также выбрасывается в сыворотку посредством действия АДАМ17/ФАПФ (ADAM17/TACE, домена 17 дезинтегрина и металлопротеиназы: фермента, превращающего фактор некроза опухоли альфа). Уровни выброшенного мезотелина в сыворотке повышаются у пациентов с раком яичников и другими видами рака. MESOMARK®, твердофазный иммуноферментный анализ, ТИФА (ELISA) для сывороточного мезотелина, одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для применения у человека в целях диагностики или мониторинга мезотелиомы. Кроме того, мезотелин применяли, в отдельности или вместе с другими маркерами, в целях диагностики или прогнозирования при других видах рака.

Корреляция уровней мезотелина в сыворотке с заболеванием навела на мысль о потенциальной роли белка мезотелина в прогрессировании рака. В то время как биологическая функция мезотелина не совсем понятна - мыши с нокаутом выглядят нормально - мезотелин, как было показано, связывается с муцином MUC16/CA-125. Была предположена роль взаимодействия мезотелина-CA-125 в клеточной адгезии, инвазии и метастазировании.

Первые антитела, полученные против мезотелина для целей терапевтического вмешательства, были сконструированы таким образом, чтобы воспрепятствовать взаимодействию между мезотелином и CA-125. Фаговый дисплей идентифицировал Fv синдрома Шегрена, С11 (SS), который после оптимизации аффинности применяли для создания рекомбинантного иммунотоксина, нацеленного на мезотелин, SS1P. Антитело MORAb-009 аматуксимаб, в котором также применяется SS1, распознает нелинейный эпитоп в пределах 64 аминоконцевых аминокислот мезотелина. Кроме того, SS1 Fv применяли для создания модифицированных химерным рецептором антигена Т-клеток. Антитела против мезотелина также применяли для получения конъюгатов лекарственных средств, таких как Анетумаб равтанзин, содержащих антитело MF-T, связанное с DM4, и антитело 7D9, конъюгированное с монометилауристатином E. Эти антитела против мезотелина также распознают аминоконцевую область белка (аминокислоты 296-390), хотя они не конкурируют с ними. Указанные антимезотелиновые нацеленные терапевтические средства, которые в настоящее время находятся в стадии клинических испытаний, показали ограниченную эффективность в качестве агентов для монотерапии.

Совсем недавно сообщалось о новых антимезотелиновых антителах, которые распознают другие участки белка мезотелина. Все еще остается необходимость в понимании того, будут ли антитела против иных эпитопов мезотелина, чем SS1/MORAb-009 (например, антитела, которые не конкурируют с выброшенным мезотелином или выброшенным CA-125), проявлять лучшую эффективность у пациентов.

Поскольку по-прежнему существует потребность в дополнительных вариантах лечения заболеваний в форме солидных опухолей, связанных с избыточной экспрессией МЗЛН (MSLN), таких как рак яичника, рак поджелудочной железы, мезотелиома, рак легкого, рак желудка и тройной отрицательный рак молочной железы, в данном изобретении предложены средства и способы решения этой проблемы в форме конструкции биспецифического антитела, содержащей связывающий домен, нацеленный на МЗЛН (MSLN) на поверхности опухолевых клеток-мишеней, и второй связывающий домен, нацеленный на CD3 на поверхности Т-клеток.

Таким образом, в первом аспекте данное изобретение относится к конструкции биспецифического антитела, содержащей первый связывающий домен, который связывается с МЗЛН (MSLN) человека на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, причем первый связывающий домен связывается с эпитопом МЗЛН (MSLN), который содержится в вариантах МЗЛН (MSLN), представленных в SEQ ID NO: 231, 232 и 233, и дополнительно связывается с МЗЛН (MSLN) *Macaca fascicularis*, представленным в SEQ ID NO: 234.

Следует отметить, что, как используется в данном документе, формы единственного числа включают в себя ссылки на множественное число, если обратное прямо не указано в тексте. Так, например, ссылка на "реагент" включает один или большее количество таких различных реагентов, а ссылка на "способ" включает ссылку на эквивалентные стадии и способы, известные специалистам в данной области техники, которые могут быть модифицированы или заменены способами, описанными в данном изобретении.

Если обратное прямо не указано в тексте, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу ряда. Специалисты в данной области техники распознают или смогут установить, с применением не более чем шаблонных экспериментов, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Такие эквиваленты включены в данное изобретение.

Термин "и/или" везде, где он используется, включает в себя значение "и", "или" и "все или любая другая комбинация элементов, связанных указанным термином".

Используемый в данном изобретении термин "около" или "приблизительно" означает в пределах плюс/минус 20%, предпочтительно в пределах плюс/минус 15%, более предпочтительно в пределах плюс/минус 10% и наиболее предпочтительно в пределах плюс/минус 5% от заданного значения или диапазона.

Во всех местах данного документа и последующей формулы изобретения, если обратное прямо не указано в тексте, слово "содержать" и вариации, такие как "содержит" и "содержащий", следует понимать как включающие указанное целое число или стадию или группу целых чисел или стадий, но не исключающее любое другое целое число или стадию или группу целых чисел или стадий. При использовании в данном документе термин "содержащий" может быть заменен термином "в том числе" или "включающий" или иногда, когда он используется в данном изобретении, термином "обладающий".

При использовании в данном документе "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в пункте формулы. При использовании в данном документе термин "по существу состоящий из" не исключает материалов или стадий, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые признаки пункта формулы.

В каждом случае в данном документе любой из терминов "содержащий", "по существу состоящий из" и "состоящий из", может быть заменен любым из двух других терминов.

Термин "конструкция антитела" относится к молекуле, в которой структура и/или функция основана(ы) на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной или цельной молекуле иммуноглобулина. Таким образом, конструкция антитела способна связываться с ее специфической мишенью или антигеном. Кроме того, конструкция антитела в соответствии с изобретением содержит минимальные структурные требования к антителу, которые позволяют связывание с мишенью. Это минимальное требование может быть, например, определено наличием по меньшей мере трех участков, определяющих комплементарность (CDR), легкой цепи (т.е., CDR1, CDR2 и CDR3 области VL) и/или трех CDR тяжелой цепи (т.е., CDR1, CDR2 и CDR3 области VH), предпочтительно всех шести CDR. Антитела, на которых основаны конструкции в соответствии с изобретением, включают в себя, например, моноклональные, рекомбинантные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные и человеческие антитела.

В определение "конструкций антител" в соответствии с изобретением включены полноразмерные или цельные антитела, включая также антитела верблюдовых и другие иммуноглобулиновые антитела, полученные биотехнологическими методами или способами или методами или способами инженерии белка. Эти полноразмерные антитела могут представлять собой, например, моноклональные, рекомбинантные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные и человеческие антитела. Кроме того, в определение "конструкций антител" включены фрагменты полноразмерных антител, такие как VH, VHH, VL, (s)dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или "r IgG", ("полуантитело"). Кроме того, конструкции антител в соответствии с изобретением могут представлять собой модифицированные фрагменты антител, которые также называют вариантами антител, такие как scFv, di-scFv или bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-зиппер, scFab, Fab2, Fab3, диатела, одноцепочечные диатела, тандемные диатела (Tandab), тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv, "мини-антитела", типичная структура которых выглядит следующим образом: (VH-VL-CH3)<sub>2</sub>, (scFv-CH3)<sub>2</sub>, ((scFv)<sub>2</sub>-CH3+CH3), ((scFv)<sub>2</sub>-CH3) или (scFv-CH3-scFv)<sub>2</sub>, мультитела, такие как триатела или тетратела, и однодоменные антитела, такие как нанотела или антитела с одним вариабельным доменом, содержащие только один вариабельный домен, который может представлять собой VHH, VH или VL, которые специфически связываются с антигеном или эпитопом независимо от других V-участков или доменов.

Связывающий домен обычно может содержать вариабельный участок легкой цепи антитела (VL) и

вариабельный участок тяжелой цепи антитела (VH); однако он не должен содержать оба. Фрагменты Fd, например, содержат два участка VH и часто сохраняют некоторую антигенсвязывающую функцию интактного антигенсвязывающего домена. Дополнительные примеры формата фрагментов антител, вариантов антител или связывающих доменов включают в себя (1) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, содержащий домены VL, VH, CL и CH1; (2) фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (3) фрагмент Fd, содержащий два домена VH и CH1; (4) фрагмент Fv, содержащий домены VL и VH одного плеча антитела, (5) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), который содержит домен VH; (6) выделенный участок, определяющий комплементарность (CDR) и (7) одноцепочечный Fv (scFv), причем последний является предпочтительным (например, полученный из библиотеки scFV). Примеры вариантов конструкций антител в соответствии с изобретением описаны, например, в WO 00/006605, WO 2005/040220, WO 2008/119567, WO 2010/037838, WO 2013/026837, WO 2013/026833, US 2014/0308285, US 2014/0302037, WO 2014/144722, WO 2014/151910 и WO 2015/048272.

Кроме того, определение термина "конструкция антитела" включает одновалентные, двухвалентные и поливалентные/мультивалентные конструкции и, таким образом, моноспецифические конструкции, специфически связывающиеся только с одной антигенной структурой, а также биспецифические и полиспецифические/мультиспецифические конструкции, которые специфически связываются с более, чем одной антигенной структурой, например, двумя, тремя или более, посредством различных связывающих доменов. Более того, определение термина "конструкция антитела" включает в себя молекулы, состоящие только из одной полипептидной цепи, а также молекулы, состоящие из более чем одной полипептидной цепи, причем цепи могут быть идентичными (гомодимеры, гомотримеры или гомогенные олигомеры) или разными (гетеродимер, гетеротример или гетероолигомер). Примеры вышеуказанных идентифицированных антител и их вариантов или их производных описаны, среди прочего, в Harlow and Lane, *Antibodies a laboratory manual*, CSHL Press (1988) и *Using Antibodies: a laboratory manual*, CSHL Press (1999), Kontermann and Dübel, *Antibody Engineering*, Springer, 2nd ed. 2010 и Little, *Recombinant Antibodies for Immunotherapy*, Cambridge University Press 2009.

Конструкции антител по данному изобретению предпочтительно представляют собой "конструкции антител, полученные *in vitro*". Этот термин относится к конструкции антитела в соответствии с вышеприведенным определением, в которой весь или часть вариабельного участка (например по меньшей мере один CDR) получена путем селекции в неиммунной клетке, например, фаговый дисплей *in vitro*, белковый чип или любой другой способ, в котором потенциальные последовательности могут быть испытаны на их способность связываться с антигеном. Таким образом, этот термин предпочтительно исключает последовательности, полученные исключительно геномной перегруппировкой в иммунной клетке животного. "Рекомбинантное антитело" представляет собой антитело, полученное с применением технологии рекомбинантной ДНК или геной инженерии.

Термин "моноклональное антитело" (mAb) или конструкция моноклонального антитела, как используется в данном документе, относится к антителу, полученному из популяции, по существу, гомогенных антител, т.е., составляющие популяцию отдельные антитела являются идентичными, за исключением возможных естественных мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, будучи направленными против одного антигенного сайта или детерминанты на антигене, в отличие от обычных (поликлональных) антител, которые обычно включают в себя различные антитела, направленные против различных детерминант (или эпитопов). В дополнение к их специфичности моноклональные антитела выгодны тем, что они синтезируются гибридомной культурой, поэтому не загрязнены другими иммуноглобулинами. Модификатор "моноклональный" указывает на характер антитела, как полученного из, по существу, гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом.

Для получения моноклональных антител можно применять любую технологию, обеспечивающую антитела, вырабатываемые непрерывными культурами клеточных линий. Например, моноклональные антитела для применения могут быть получены при помощи метода гибридомы, впервые описанного Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975) или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). Примеры дополнительных технологий получения человеческих моноклональных антител включают в себя метод триомы, метод гибридомы В-клеток человека (Kozbor, *Immunology Today* 4 (1983), 72) и метод гибридомы вируса Эпштейна-Барр, ВЭБ (EBV)-гибридомы (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96).

В дальнейшем гибридомы могут быть подвергнуты скринингу с применением стандартных методов, таких как твердофазный иммуоферментный анализ, ТИФА (ELISA) и анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (BIACORE™), для идентификации одной или большего количества гибридом, которые вырабатывают антитело, специфически связывающееся с указанным антигеном. В качестве иммуногена можно применять любую форму соответствующего антигена, например рекомбинантный антиген, природные формы, любые их варианты или фрагменты, а также их антигенный пептид. Поверхностный плазмонный резонанс, применяемый в системе BIACore, может быть применен для повышения

эффективности фаговых антител, которые связываются с эпитопом целевого антигена, такого как МЗЛН (MSLN) или КДЗ (CD3)-ипсилон (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13).

Другой типичный способ получения моноклональных антител включает в себя скрининговые библиотеки экспрессии белка, например фаговый дисплей или библиотеки рибосомного дисплея. Фаговый дисплей описан, например, в Ladner et al., патент США № 5223409; Smith (1985) Science 228:1315-1317, Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991).

В дополнение к применению библиотек дисплея соответствующий антиген может быть применен для иммунизации животного, не относящегося к человеку, например, грызуна (такого как мышь, хомяк, кролик или крыса). В одном варианте осуществления изобретения животное, не относящееся к человеку, включает в себя по меньшей мере часть гена человеческого иммуноглобулина. Например, можно сконструировать породы мышей с недостаточностью выработки мышинных антител, с большими фрагментами локусов Ig (иммуноглобулина) человека. С применением технологии гибридомы можно получать и отбирать антигенспецифические моноклональные антитела, полученные из генов с желаемой специфичностью. См., например, XENOMOUSE™, Green et al. (1994) Nature Genetics 7: 13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096 и WO 96/33735.

Моноклональное антитело также может быть получено из организма животного, не относящегося к человеку, а затем модифицировано, например, гуманизировано, деиммунизировано, сделано химерным и т.д., с применением технологий рекомбинантной ДНК, известных в данной области техники. Примеры модифицированных конструкций антител включают в себя гуманизированные варианты антител, не относящихся к человеку, антитела "с созревшей аффинностью" (см., например, Hawkins et al., J. Mol. Biol., 254, 889-896 (1992) и Lowman et al. Biochemistry 30, 10832-10837 (1991)) и антитела-мутанты с модифицированной(ыми) эффекторной(ыми) функцией(ями) (см., например, патент США 5648260, Kontermann and Dübel (2010), в приводившейся выше цитате, и Little (2009), в приводившейся выше цитате).

В иммунологии созревание аффинности представляет собой процесс, при помощи которого В-клетки вырабатывают антитела с повышенной аффинностью к антигену в ходе иммунного ответа. При повторном контакте с тем же антигеном хозяин будет вырабатывать антитела с последовательно более высокой аффинностью. Как и естественный прототип, созревание аффинности *in vitro* основано на принципах мутации и селекции. Созревание аффинности *in vitro* было успешно применено для оптимизации антител, конструкций антител и фрагментов антител. Случайные мутации внутри CDR вводят с применением излучения, химических мутагенов или ПЦР с применением неточной полимеразы. Кроме того, генетическое разнообразие может быть увеличено путем перестановки цепей. Два или три раунда мутации и отбора с применением методов дисплея, таких как фаговый дисплей, обычно дают фрагменты антител с аффинностью в области низких наномолярных значений.

Предпочтительный тип получения вариантов (variation) с заменой аминокислот для конструкций антител включает в себя замену одного или большего количества остатков гипервариабельного участка исходного антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, полученный(е) вариант(ы), отобранный(е) для дальнейшей разработки, будет(ут) иметь улучшенные биологические свойства относительно исходного антитела, из которого они получены. Удобный способ генерации таких вариантов с заменой включает в себя созревание аффинности с применением фагового дисплея. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельного участка (например, 6-7 сайтов) подвергают мутации, чтобы получить все возможные аминокислотные замены в каждом сайте. Полученные таким образом варианты антител показывают одновалентным способом из частиц нитчатого фага в виде слияний с продуктом гена III M13, упакованным в каждую частицу. Показанные на фаге варианты в дальнейшем подвергают скринингу на их биологическую активность (например, аффинность связывания), как описано в данном документе. С целью идентификации потенциальных сайтов гипервариабельных участков для модификации, может быть выполнен аланинсканирующий мутагенез, чтобы идентифицировать остатки гипервариабельного участка, в значительной мере способствующие связыванию с антигеном. В качестве альтернативы или дополнительно, может быть полезным проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между связывающим доменом и, например, МЗЛН (MSLN) человека. Такие контактирующие остатки и соседние остатки являются кандидатами на замену в соответствии со способами, разработанными в данном изобретении. После получения таких вариантов, панель вариантов подвергают скринингу, как описано в данном документе, и антитела с превосходящими свойствами по данным одного или большего количества релевантных анализов могут быть выбраны для дальнейшей разработки.

Моноклональные антитела и конструкции антител по данному изобретению конкретно включают в себя "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретного вида, или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная(ые) цепь(и) идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (патент США №

4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Предложенные в данном изобретении химерные антитела включают в себя "примитивизированные" ("primitized") антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности переменного домена, полученные от приматов, не относящихся к человеку (например, старосветская мартышка, человекообразная обезьяна и т.д.) и человеческие последовательности константного участка. Описаны различные подходы к созданию химерных антител. См., например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851, 1985; Takeda et al., Nature 314:452, 1985, Cabilly et al., патент США № 4816567; Boss et al., патент США № 4816397; Tanaguchi et al., EP 0171496; EP 0173494 и GB 2177096.

Кроме того, антитело, конструкция антитела, фрагмент антитела или вариант антитела могут быть модифицированы путем специфической делеции эпитопов Т-клеток человека (метод под названием "деиммунизация") способами, описанными, например, в WO 98/52976 или WO 00/34317. Вкратце переменные домены тяжелой и легкой цепи антитела могут быть проанализированы для пептидов, которые связываются с главным комплексом гистосовместимости, ГКГ (МНС) класса II; эти пептиды представляют собой потенциальные Т-клеточные эпитопы (как определено в WO 98/52976 и WO 00/34317). Для обнаружения потенциальных Т-клеточных эпитопов может быть применен подход компьютерного моделирования под названием "белковая нить", и, кроме того, в базе данных пептидов, связывающихся с ГКГ (МНС) класса II человека, можно провести поиск мотивов, присутствующих в последовательностях VH и VL, как описано в WO 98/52976 и WO 00/34317. Эти мотивы связываются с любым из 18 основных аллотипов DR ГКГ (МНС) класса II и, таким образом, представляют собой потенциальные Т-клеточные эпитопы. Найденные потенциальные Т-клеточные эпитопы могут быть удалены путем замены небольшого количества аминокислотных остатков в переменных доменах или, предпочтительно, путем замены одной аминокислоты. Как правило, производятся консервативные замены. Часто, но не исключительно, можно использовать аминокислоту, общую для положения в последовательностях антител зародышевой линии человека. Последовательности зародышевой линии человека раскрыты, например, в Tomlinson, et al. (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798; Cook, G.P. et al. (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; и Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14: 14: 4628-4638. Каталог V BASE представляет собой полный каталог последовательностей переменных участков иммуноглобулина человека (составленный Tomlinson, LA. et al., Центр белковой инженерии MRC, Кембридж, Великобритания). Эти последовательности могут быть применены как источник последовательности человека, например, для каркасных участков и CDR. Кроме того, можно использовать консенсусные каркасные участки человека, например, как описано в патенте США № 6300064.

"Гуманизированные" антитела, конструкции антител, их варианты или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител) представляют собой антитела или иммуноглобулины, в основном с человеческими последовательностями, которые содержат (а) минимальную(ые) последовательность(и), полученную(ые) из иммуноглобулина, не относящегося к человеку. По большей части, гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки гиперварибельного участка (также CDR) реципиента заменены остатками гиперварибельного участка вида, не относящегося к человеку (например, грызуна) (антитело-донор), такого как мышь, крыса, хомяк или кролик, обладающими требуемой специфичностью, аффинностью и способностью. В некоторых случаях остатки Fv каркасного участка, KU (FR) человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками, не относящимися к человеку. Кроме того, "гуманизированные антитела", как используется в данном документе, могут дополнительно содержать остатки, которые не найдены ни в антителе-реципиенте, ни в антителе-доноре. Такие модификации осуществляют с целью дальнейшего совершенствования и оптимизации эффективности антитела. Кроме того, гуманизированное антитело может содержать по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, из иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации см. Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988); и Presta, Curg. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

Гуманизированные антитела или их фрагменты могут быть получены путем замены последовательностей переменного домена Fv, которые не имеют непосредственного отношения к связыванию с антигеном, эквивалентными последовательностями из переменных доменов Fv человека. Типичные способы получения гуманизированных антител или их фрагментов предложены Morrison (1985) Science 229: 1202-1207; Oi et al. (1986) BioTechniques 4: 214; и в US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 5859205; и US 6407213. Эти способы включают в себя выделение, манипулирование и экспрессию последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют все или часть переменных доменов Fv иммуноглобулина по меньшей мере из одной тяжелой или легкой цепи. Такие нуклеиновые кислоты могут быть получены из гибридомы, вырабатывающей антитело против заданной мишени, как описано выше, а также из других источников. Рекомбинантную ДНК, кодирующую молекулу гуманизированного антитела, в дальнейшем можно клонировать в подходящий вектор экспрессии.

Кроме того, гуманизированные антитела могут быть получены с применением трансгенных животных, таких как мыши, которые экспрессируют гены тяжелой и легкой цепи человека, но неспособны экспрессировать эндогенные гены тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина мыши. Winter описывает ти-

пичный способ пересадки CDR, который может быть применен для получения гуманизированных антител, описанных в данном изобретении (патент США № 5225539). Все CDR конкретного антитела человека могут быть заменены по меньшей мере частью CDR, не относящихся к человеку, или только некоторые из CDR могут быть заменены CDR, не относящимися к человеку. Необходимо только заменить количество CDR, необходимых для связывания гуманизированного антитела с заданным антигеном.

Гуманизированное антитело может быть оптимизировано путем введения консервативных замен, замен консенсусной последовательности, замен зародышевой линии и/или обратных мутаций. Такие модифицированные молекулы иммуноглобулина могут быть получены по любой из нескольких технологий, известных в данной области техники (например, Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor et al., Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson et al., Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982, и EP 239400).

Термин "человеческое антитело", "конструкция человеческого антитела" и "связывающий домен человека" включает в себя антитела, конструкции антител и связывающие домены, которые содержат участки антитела, такие как переменные и константные участки или домены, которые по существу соответствуют последовательностям иммуноглобулина зародышевой линии человека, известным в данной области техники, включая в себя, например, те, которые описаны Kabat et al. (1991) (в приводившейся выше цитате). Антитела человека, конструкции антител или связывающие домены по изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Человеческие антитела, конструкции антител или связывающие домены могут содержать по меньшей мере одно, два, три, четыре, пять или более положений, замененных аминокислотным остатком, который не кодируется последовательностью иммуноглобулина зародышевой линии человека. Определение человеческих антител, конструкций антител и связывающих доменов, как используется в данном документе, дополнительно включает полностью человеческие антитела, которые включают в себя только последовательности человеческих антител, не являющиеся искусственно и/или генетически модифицированными, как те, которые могут быть получены с применением таких технологий или систем, как Xenomouse.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкции антитела по изобретению представляют собой "выделенные" или "по существу чистые" конструкции антител. "Выделенный" или "по существу чистый", при использовании для описания конструкций антител, раскрытых в данном изобретении, означает конструкцию антитела, которая была идентифицирована, отделена и/или выделена из компонента среды, в которой она была продуцирована.

Предпочтительно конструкция антитела является свободной или по существу свободной от всех других компонентов среды, в которой она была продуцирована. Загрязняющие компоненты среды, в которой она была продуцирована, такие как рекомбинантные трансфектированные клетки, представляют собой материалы, которые обычно могли бы препятствовать диагностическому или терапевтическому применению полипептида, и могут включать в себя ферменты, гормоны и другие растворенные вещества белковой или небелковой природы. Содержание конструкций антител может составлять, например, по меньшей мере примерно 5% или по меньшей мере примерно 50 мас.% от общего белка в конкретном образце. Необходимо понимать, что, в зависимости от обстоятельств, содержание выделенного белка может составлять от 5 до 99,9 мас.% от содержания общего белка. Полипептид может быть получен в значительно более высокой концентрации за счет применения индуцибельного промотора или промотора с высоким уровнем экспрессии, таким образом, что он вырабатывается с повышенными уровнями концентрации. Определение включает в себя получение конструкции антитела в широком спектре организмов и/или клеток-хозяев, которые известны в данной области техники. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения конструкция антитела будет очищена (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с применением секвенатора с вращающимся стаканом, или (2) до гомогенности при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, ДНС-ПААГ (SDS-PAGE) в восстанавливающих или восстанавливающих условиях с применением Кумасси синего или предпочтительно серебрянки. Обычно, однако, выделенная конструкция антитела будет получена при помощи по меньшей мере одной стадии очистки.

Термин "связывающий домен" описывает в связи с данным изобретением домен, который (специфически) связывается/взаимодействует с/распознает конкретный целевой эпитоп или конкретный целевой сайт на молекулах-мишенях (антигенах), в данном изобретении: МЗЛН (MSLN) и КДЗ (CD3), соответственно. Структура и функция первого связывающего домена (распознающего МЗЛН (MSLN)) и предпочтительно также структура и/или функция второго связывающего домена (распознающего КДЗ (CD3)) основана(ы) на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной или цельной молекулы иммуноглобулина. Согласно изобретению первый связывающий домен характеризуется наличием трех CDR легкой цепи (т.е., CDR1, CDR2 и CDR3 участки VL) и/или трех CDR тяжелой цепи (т.е., CDR1, CDR2 и CDR3 участки VH). Кроме того, второй связывающий домен предпочтительно содержит минимальные структурные требования к антителу, которые позволяют связывание с мишенью. Более пред-

почтительно второй связывающий домен содержит по меньшей мере три CDR легкой цепи (т.е., CDR1, CDR2 и CDR3 участки VL) и/или три CDR тяжелой цепи (т.е., CDR1, CDR2 и CDR3 участки VH). Предполагается, что первый и/или второй связывающий домен получен или может быть получен при помощи скрининговых методов фагового дисплея или библиотеки, а не путем пересадки последовательностей CDR из ранее существовавшего (моноклонального) антитела в каркас.

В соответствии с данным изобретением связывающие домены находятся в форме одного или большего количества полипептидов. Такие полипептиды могут содержать белковые части и небелковые части (например, химические линкеры или химические поперечно-сшивающие агенты, такие как глутаровый альдегид). Белки (включая их фрагменты, предпочтительно биологически активные фрагменты и пептиды, обычно содержащие менее чем 30 аминокислот) содержат две или более аминокислот, связанных друг с другом посредством ковалентной пептидной связи (с образованием цепи аминокислот). Как используется в данном изобретении, термин "полипептид" описывает группу молекул, которые обычно состоят из более чем 30 аминокислот. Полипептиды могут дополнительно образовывать мультимеры, такие как димеры, тримеры и высшие олигомеры, т.е., состоящие из более чем одной молекулы полипептида. Молекулы полипептидов, образующие такие димеры, тримеры и т.д., могут быть идентичными или неидентичными. Соответствующие структуры таких мультимеров более высокого порядка, следовательно, называются гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и т.д. Примером гетеромультимера является молекула антитела, которая в своей естественной форме состоит из двух идентичных легких полипептидных цепей и двух идентичных тяжелых полипептидных цепей. Термины "пептид", "полипептид" и "белок" дополнительно относятся к естественно модифицированным пептидам/полипептидам/белкам, в которых модификация осуществляется, например, посредством посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и тому подобное. Кроме того, "пептид", "полипептид" или "белок", упоминаемый в данном изобретении, может быть химически модифицирован, например, пегилирован. Такие модификации хорошо известны в данной области техники и описаны ниже.

Предпочтительно связывающий домен, который связывается с МЗЛН (MSLN), и/или связывающий домен, который связывается с КДЗ (CD3), является(ются) человеческими связывающими доменами. Антитела и конструкции антител, содержащие по меньшей мере один человеческий связывающий домен, позволяют избежать некоторых проблем, связанных с антителами или конструкциями антител, которые содержат переменные и/или константные участки, не относящиеся к человеку, например, грызуна (например, мышевидного, крысы, хомяка или кролика). Наличие таких белков, полученных из организма грызуна, может приводить к быстрому клиренсу антител или конструкций антител или может приводить к возникновению иммунного ответа против антитела или конструкции антитела у пациента. Чтобы избежать применения антител или конструкций антител, полученных из организма грызуна, человеческие или полностью человеческие антитела/конструкции антител могут быть получены путем введения функции человеческого антитела в организм грызуна, таким образом, что грызун вырабатывает полностью человеческие антитела.

Возможность клонировать и реконструировать человеческие локусы размером миллионы оснований в искусственной дрожжевой хромосоме, ИДХ (YAC) и вводить их в зародышевую линию мышцы обеспечивает мощный подход к прояснению функциональных компонентов очень больших или грубо картированных локусов, а также к созданию полезных моделей заболеваний человека. Кроме того, применение такой технологии для замены локусов мышцы их человеческими эквивалентами может обеспечить уникальное понимание экспрессии и регуляции генных продуктов человека во время развития, их коммуникации с другими системами и их участия в индукции и развитии заболевания.

Важным практическим применением такой стратегии является "гуманизация" гуморальной иммунной системы мышцы. Введение локусов иммуноглобулина человека (Ig) в организм мышей, у которых инактивированы эндогенные гены Ig, дает возможность изучить механизмы, лежащие в основе запрограммированной экспрессии и сборки антител, а также их роль в развитии В-клеток. Более того, такая стратегия могла бы стать идеальным источником для производства полностью человеческих моноклональных антител (mAb) - важной вехой в направлении выполнения обещания относительно лечения антителами заболеваний человека. Ожидается, что полностью человеческие антитела или конструкции антител минимизируют иммуногенные и аллергические реакции, присущие mAb мышши или дериватизированным mAb мышши и, таким образом, повысят эффективность и безопасность вводимых антител/конструкций антител. Можно ожидать, что применение полностью человеческих антител или конструкций антител обеспечит существенное преимущество при лечении хронических и рецидивирующих заболеваний человека, таких как воспаление, аутоиммунные реакции и рак, которые требуют повторного введения соединения.

Один из подходов к этой цели заключался в том, чтобы сконструировать породы мышши с недостаточной выработкой антител мышши, с большими фрагментами локусов Ig человека, в ожидании того, что такие мышши могли бы вырабатывать большой репертуар антител человека в отсутствие мышшиных антител. Большие фрагменты Ig человека сохраняли бы большое разнообразие переменных генов, а также надлежащую регуляцию выработки и экспрессии антител. Путем применения аппарата мышши для дивер-



сификации и селекции антител и отсутствия иммунологической толерантности к белкам человека воспроизводимый репродуктор человеческих антител у этих пород мышей должен давать антитела с высокой аффинностью против любого антигена, представляющего интерес, включая человеческие антигены. С применением технологии гибридомы могут быть легко получены и отобраны антигенспецифические человеческие mAb с желаемой специфичностью. Эта общая стратегия была продемонстрирована в связи с получением первых пород мышей XenoMouse (см. Green et al. *Nature Genetics* 7: 13-21 (1994)). Штаммы XenoMouse были сконструированы при помощи искусственных дрожжевых хромосом, ИДХ (YAC), содержащих фрагменты конфигурации зародышевой линии размером 245 тыс. о. и 190 тыс. о. в локусе тяжелой цепи человека и локусе легкой цепи каппа, соответственно, которые содержали ключевые последовательности переменного и константного участка. ИДХ (YAC), содержащая человеческий Ig, оказалась совместимой с системой мыши как для перегруппировки, так и для экспрессии антител и была способна заменить инактивированные гены Ig мыши. Это было продемонстрировано их способностью индуцировать развитие В-клеток, вырабатывать подобный взрослому человеческий репертуар полностью человеческих антител и генерировать антигенспецифические человеческие mAb. Эти результаты также наводили на мысль о том, что введение больших порций локусов Ig человека, содержащих большее количество V-генов, дополнительные регуляторные элементы и константные участки Ig человека, может воспроизвести по существу полный репертуар, характерный для гуморального ответа человека на инфекцию и иммунизацию. Работа Green et al. недавно была распространена на введение более чем около 80% репертуара человеческих антител посредством введения фрагментов ИДХ (YAC) конфигурации зародышевой линии размером в миллионы оснований локусов тяжелой цепи человека и локусов легкой цепи каппа, соответственно. См. Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) и патентную заявку США сер. № 08/759620.

Получение мышей XenoMouse дополнительно обсуждается и охарактеризовано в патентных заявках США сер. № 07/4 66008, сер. № 07/610515, сер. № 07/919297, сер. № 07/922649, сер. № 08/031801, сер. № 08/112848, сер. № 08/234145, сер. № 08/376279, сер. № 08/430938, сер. № 08/464584, сер. № 08/464582, сер. № 08/463191, сер. № 08/462837, сер. № 08/486853, сер. № 08/486857, сер. № 08/486859, сер. № 08/462513, сер. № 08/724752 и сер. № 08/759620; и патентах США №№ 6162963; 6150584; 6114598; 6075181 и 5939598 и патентах Японии №№ 3068180 B2, 3068506 B2 и 3068507 B2. См. также Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) и Green and Jakobovits J. *Exp. Med.* 188:483-495 (1998), EP 0463151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 и WO 03/47336.

В альтернативном подходе другие, включая GenPharm International, Inc., применили подход "мини-локуса". В подходе мини-локуса экзогенный локус Ig имитируется путем включения фрагментов (отдельных генов) локуса Ig. Таким образом, один или большее количество VH-генов, один или большее количество DH-генов, один или большее количество JH-генов, константный участок мю и второй константный участок (предпочтительно константный участок гамма) формируются в конструкции для введения животному. Этот подход описан в патенте США № 5545807, Surani et al., и патентах США №№ 5545806; 5625825; 5625126; 5633425; 5661016; 5770429; 5789650; 5814318; 5877397; 5874299; и 6255458, каждый выдан Lonberg и Kay, патентах США №№ 5591669 и 6023010, выданных Krimpenfort и Berns, патентах США №№ 5612205; 5721367 и 5789215, выданных Berns et al., и патенте США № 5643763, выданном Choi и Dunn, а также в патентной заявке США GenPharm International сер. № 07/574748, сер. № 07/575962, сер. № 07/810279, сер. № 07/853408, сер. № 07/904068, сер. № 07/990860, сер. № 08/053131, сер. № 08/096762, сер. № 08/155301, сер. № 08/161739, сер. № 08/165699, сер. № 08/209741. См. также EP 0546073 B1 WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 и WO 98/24884 и патент США № 5981175. Дополнительно см. Taylor et al. (1992), Chen et al. (1993), Tuailon et al. (1993), Choi et al. (1993), Lonberg et al. (1994), Taylor et al. (1994) и Tuailon et al. (1995), Fishwild et al. (1996).

Kirip также продемонстрировал выработку человеческих антител у мышей, в организм которых посредством микроклеточного слияния были введены большие фрагменты хромосом или целые хромосомы. См. Европейские патентные заявки №№ 773288 и 843961. Xenex Biosciences разрабатывает технологию для потенциальной генерации человеческих антител. В этой технологии организм мышей SCID преобразуют при помощи лимфатических клеток человека, например, В- и/или Т-клеток. Затем мышей иммунизируют антигеном, причем они способны генерировать иммунный ответ против антигена. См. патенты США №№ 5476996; 5698767; и 5958765.

Реакция в форме человеческого антимышиного антитела, ЧАМА (НАМА) привела к тому, что в промышленности стали получать химерные или иным способом гуманизированные антитела. Тем не менее, ожидается, что некоторые реакции человека против химерного антитела, ЧПХА (НАСА) будут наблюдаться, особенно при хроническом или многократном применении антитела. Таким образом, было бы желательно предложить конструкции антител, содержащие человеческий связывающий домен против МЗЛН (MSLN) и человеческий связывающий домен против КД3 (CD3), чтобы устранить озабоченность и/или влияние реакции ЧАМА (НАМА) или ЧПХА (НАСА).

Термины "(специфически) связывается с", "(специфически) распознает", "(специфически) направлен на" и "(специфически) реагирует с" в соответствии с данным изобретением означают, что связываю-

щий домен взаимодействует или специфически взаимодействует с данным эпитопом или данным целевым сайтом на молекуле-мишени (антигенами), в данном изобретении: МЗЛН (MSLN) и КДЗ (CD3), соответственно.

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым специфически связывается связывающий домен, такой как антитело или иммуноглобулин или производное, фрагмент или вариант антитела или иммуноглобулина. "Эпитоп" является антигенным, и поэтому термин эпитоп в данном изобретении иногда дополнительно относится к "антигенной структуре" или "антигенной детерминанте". Таким образом, связывающий домен является "сайтом взаимодействия с антигеном". Указанное связывание/взаимодействие также понимается как определяющее "специфическое распознавание".

"Эпитопы" могут образовываться как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, которые сближены в результате третичного свертывания белка. "Линейный эпитоп" представляет собой эпитоп, в котором первичная последовательность аминокислот составляет распознаваемый эпитоп. Линейный эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 и более обычно по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 или по меньшей мере 7, например, от 8 до 10 аминокислот в уникальной последовательности.

"Конформационный эпитоп", в отличие от линейного эпитопа, представляет собой эпитоп, в котором первичная последовательность аминокислот, составляющая эпитоп, не является единственным определяющим компонентом распознаваемого эпитопа (например, эпитопа, в котором первичная последовательность аминокислот не обязательно распознается связывающим доменом). Обычно конформационный эпитоп содержит большее количество аминокислот, чем линейный эпитоп. Что касается распознавания конформационных эпитопов, связывающий домен распознает трехмерную структуру антигена, предпочтительно пептида или белка или его фрагмента (в контексте данного изобретения антигенная структура для одного из связывающих доменов находится в пределах белка МЗЛН (MSLN)). Например, если молекула белка сворачивается с образованием трехмерной структуры, некоторые аминокислоты и/или полипептидный скелет, образующие конформационный эпитоп, сближаются, позволяя антителу распознавать эпитоп. Методы определения конформации эпитопов включают в себя, но не ограничиваясь этим, рентгеновскую кристаллографию, двумерную спектроскопию ядерного магнитного резонанса, 2М-ЯМР (2D-NMR) и сайт-направленную спектроскопию со спиновой меткой и спектроскопию электронного парамагнитного резонанса, ЭПР (EPR).

Способ картирования эпитопов описан следующим образом: если участок (непрерывный отрезок аминокислот) в белке МЗЛН (MSLN) человека заменяется соответствующим участком антигена МЗЛН (MSLN), не относящимся к человеку и не относящимся к примату (например, МЗЛН (MSLN) мыши, хотя другие, такие как цыпленок, крыса, хомяк, кролик и т.д., также могут быть подходящими), ожидается уменьшение связывания связывающего домена, если только связывающий домен не является перекрестно-реагирующим на применяемый МЗЛН (MSLN), не относящийся к человеку и не относящийся к примату. Указанное снижение предпочтительно составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40 или 50%; более предпочтительно по меньшей мере 60, 70 или 80% и наиболее предпочтительно 90, 95 или даже 100% по сравнению со связыванием с соответствующим участком белка МЗЛН (MSLN) человека, притом, что связывание с соответствующим участком белка МЗЛН (MSLN) человека принимается за 100%. Предполагается, что вышеуказанные химеры МЗЛН (MSLN) человека/МЗЛН (MSLN), не относящегося к человеку, экспрессируются в клетках яичника китайского хомяка, ЯКХ (CHO). Кроме того, химеры МЗЛН (MSLN) человека/МЗЛН (MSLN), не относящегося к человеку, могут быть слиты с трансмембранным доменом и/или цитоплазматическим доменом другого связанного с мембраной белка, такого как адгезивная молекула эпителиальных клеток, АМЭК (EPCAM), хотя такая технология не была необходимой для способа, описанного в примерах 1 и 2.

В альтернативном или дополнительном способе картирования эпитопов могут быть сгенерированы несколько укороченных версий внеклеточного домена МЗЛН (MSLN) человека, чтобы определить конкретный участок, который распознается связывающим доменом. В этих укороченных версиях различные внеклеточные домены/субдомены или участки МЗЛН (MSLN) поэтапно удаляются, начиная с N-конца. Укороченные версии МЗЛН (MSLN) могут быть экспрессированы в клетках ЯКХ (CHO). Кроме того, предполагается, что укороченные версии МЗЛН (MSLN) могут быть слиты с трансмембранным доменом и/или цитоплазматическим доменом другого связанного с мембраной белка, такого как АМЭК (EPCAM). Дополнительно предполагается, что укороченные версии МЗЛН (MSLN) могут содержать на N-конце домен сигнального пептида, например, сигнальный пептид, полученный из сигнального пептида тяжелой цепи IgG мыши. Кроме того, предполагается, что укороченные версии МЗЛН (MSLN) содержат на N-конце домен v5 (после сигнального пептида), который позволяет проверить правильность их экспрессии на поверхности клетки. Ожидается, что произойдет снижение или утрата связывания с этими укороченными версиями МЗЛН (MSLN), которые больше не содержат участка МЗЛН (MSLN), распознаваемого связывающим доменом. Уменьшение связывания предпочтительно составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50%; более предпочтительно по меньшей мере 60, 70, 80% и наиболее предпочтительно 90, 95 или даже 100%, при этом связывание с полноразмерным белком МЗЛН (MSLN) человека (или его внеклеточным участком или доменом) принимается за 100%.

Другим методом определения вклада конкретного остатка целевого антигена в распознавание кон-струкцией антитела или связывающим доменом является аланиновое сканирование (см., например, Morrison KL & Weiss GA. *Cur Opin Chem Biol.* 2001 Jun; 5(3): 302-7), при котором каждый остаток, подлежащий анализу, заменяется аланином, например, путем сайт-направленного мутагенеза. Аланин применяется из-за его необъемной, химически инертной, метильной функциональной группы, тем не менее имитирующей ссылки вторичной структуры, которыми обладают многие другие аминокислоты. Иногда объемные аминокислоты, такие как валин или лейцин, можно применять в тех случаях, когда желателно сохранить размер мутантных остатков. Аланиновое сканирование представляет собой развитую технологию, которая применяется в течение длительного периода времени.

Взаимодействие между связывающим доменом и эпитопом или участком, содержащим эпитоп, подразумевает, что связывающий домен проявляет заметную аффинность к эпитопу/участку, содержащему эпитоп, на конкретном белке или антигене (в данном изобретении: МЗЛН (MSLN) и КДЗ (CD3), соответственно) и, как правило, не проявляет значительной реакционной способности в отношении белков или антигенов, отличных от МЗЛН (MSLN) или КДЗ (CD3). "Заметная аффинность" включает в себя связывание с аффинностью около  $10^{-6}$  М (константа диссоциации, KD), или сильнее. Предпочтительно связывание считается специфическим, если аффинность связывания составляет от  $10^{-12}$  до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-12}$  до  $10^{-9}$  М, от  $10^{-12}$  до  $10^{-10}$  М, от  $10^{-11}$  до  $10^{-8}$  М, предпочтительно от  $10^{-11}$  до  $10^{-9}$  М. Специфически ли связывающий домен реагирует с или связывается с мишенью, можно с легкостью проверить, среди прочего, путем сравнения реакции указанного связывающего домена с целевым белком или антигеном с реакцией указанного связывающего домена с белками или антигенами, отличными от МЗЛН (MSLN) или КДЗ (CD3). Предпочтительно связывающий домен по данному изобретению по существу или в существенной мере не связывается с белками или антигенами, отличными от МЗЛН (MSLN) или КДЗ (CD3) (т.е., первый связывающий домен не способен связываться с белками, отличными от МЗЛН (MSLN), а второй связывающий домен не способен связываться к белкам, отличным от КДЗ (CD3)).

Термин "по существу/в существенной мере не связывается" или "не способен к связыванию" означает, что связывающий домен по данному изобретению не связывается с белком или антигеном, отличным от МЗЛН (MSLN) или КДЗ (CD3), т.е., не проявляет реакционной способности более чем 30%, предпочтительно не более чем 20%, более предпочтительно не более чем 10%, особенно предпочтительно не более чем 9, 8, 7, 6 или 5% в отношении белков или антигенов, отличных от МЗЛН (MSLN) или КДЗ (CD3), причем связывание с МЗЛН (MSLN) или КДЗ (CD3), соответственно, принимается за 100%.

Считается, что специфическое связывание осуществляется конкретными мотивами в аминокислотной последовательности связывающего домена и антигена. Таким образом, связывание достигается в результате их первичной, вторичной и/или третичной структуры, а также в результате вторичных модификаций указанных структур. Специфическое взаимодействие сайта взаимодействия с антигеном с его специфическим антигеном может привести к простому связыванию указанного сайта с антигеном. Кроме того, специфическое взаимодействие сайта взаимодействия с антигеном с его специфическим антигеном может, в качестве альтернативы или дополнительно, приводить к инициированию сигнала, например, вследствие индукции изменения конформации антигена, олигомеризации антигена и т.д.

Кроме того, в одном варианте реализации изобретения второй связывающий домен предпочтительно связывается с CD3-ипсилон человека и с CD3 ипсилон *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* или *Saimiri sciureus*.

В другом аспекте данное изобретение относится к конструкции биспецифического антитела, содержащей первый связывающий домен, который связывается с МЗЛН (MSLN) человека на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с КДЗ (CD3) человека на поверхности Т-клетки, причем первый связывающий домен связывается с эпитопом МЗЛН (MSLN), находящимся в пределах участка МЗЛН (MSLN) человека, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO, выбранной из группы, состоящей из представленного в SEQ ID NO: 244 (кластер 1 плюс 2), SEQ ID NO: 245 (кластер 2 плюс 3) и SEQ ID NO: 241 (кластер 4).

Предпочтительно первый связывающий домен конструкции биспецифического антитела по изобретению содержит участок VH, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и участок VL, который содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из следующего:

- a) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 151, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 152, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 153, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 154, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 155 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 156;
- b) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 161, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 162, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 163, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 164, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 165 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 166;
- c) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 171, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 172, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 173, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 174, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 175 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 176;
- d) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 181, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 182, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 183, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 184, CDR-L2, представ-

ленного в SEQ ID NO: 185 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 186;

е) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 191, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 192, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 193, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 194, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 195 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 196;

ф) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 201, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 202, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 203, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 204, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 205 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 206;

г) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 211, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 212, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 213, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 214, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 215 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 216; а также

h) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 221, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 222, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 223, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 224, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 225 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 226.

Термин "вариабельный" относится к частям антитела или доменам иммуноглобулина, которые проявляют изменчивость последовательности и которые принимают участие в определении специфичности и аффинности связывания конкретного антитела (т.е., "вариабельный(ые) домена(ы)"). Спаривание вариабельной тяжелой цепи (VH) с вариабельной легкой цепью (VL) образует один антигенсвязывающий сайт.

Изменчивость распределяется неравномерно по вариабельным доменам антител; она сосредоточена в субдоменах каждого из вариабельных участков тяжелой и легкой цепей. Эти субдомены называются "гипервариабельными участками" или "участками, определяющими комплементарность" (CDR). Более консервативные (т.е., не гипервариабельные) части вариабельных доменов называются "каркасными" участками, KV (FRM или FR) и обеспечивают каркас для шести CDR в трехмерном пространстве для образования антигенсвязывающей поверхности. Вариабельные домены встречающихся в природе тяжелых и легких цепей содержат четыре участка FRM (FR1, FR2, FR3 и FR4), в основном принимающих конфигурацию  $\beta$ -листа, соединенную тремя гипервариабельными участками, которые образуют петли, соединяющие, а в некоторых случаях образующие часть структуры  $\beta$ -листа. Гипервариабельные участки в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости от FRM и вместе с гипервариабельными участками другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта (см. Kabat et al., в приводившейся выше цитате).

Термин "CDR" в единственном и множественном числе относится к участку, определяющему комплементарность, который в количестве трех определяет связывающий характер вариабельного участка легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3) и в количестве трех определяет связывающий характер вариабельного участка тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3). CDR содержат большую часть остатков, ответственных за специфическое взаимодействие антитела с антигеном, и, следовательно, способствуют функциональной активности молекулы антитела: они являются основными детерминантами антигенной специфичности.

Конкретные границы определения CDR и их длина определяются в разных системах классификации и нумерации. Поэтому CDR могут ссылаться на Kabat, Chothia, контактное или любые другие определения границ, включая описанную в данном документе систему нумерации. Несмотря на варьирующие границы, каждой из этих систем присуща некоторую степень перекрытия в том, что составляет так называемые "гипервариабельные участки" в вариабельных последовательностях. Таким образом, определения CDR в соответствии с этими системами могут различаться по длине и граничным областям относительно смежного каркасного участка. См. например, Kabat (подход, основанный на изменчивости перекрестно-видовой последовательности), Chothia (подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антигена-антитела) и/или MacCallum (Kabat et al., в приводившейся выше цитате, Chothia et al., J. Mol. Biol, 1987, 196: 901-917 и MacCallum et al., J. Mol. Biol, 1996, 262: 732). Еще одним стандартом для характеристики сайта связывания с антигеном является определение AbM, используемое в программном обеспечении для моделирования антител AbM Oxford Molecular. См., например, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. В: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). В той мере, в которой две методологии идентификации остатков определяют области перекрывающихся, но не идентичных участков, их можно объединить для определения гибридного CDR. Однако нумерация в соответствии с так называемой системой Kabat является предпочтительной.

Как правило, CDR образуют петлевую структуру, которая может быть классифицирована как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к конформации основной цепи, которая принимается антигенсвязывающими петлями (CDR). В сравнительных структурных исследованиях было установлено, что пять из шести антигенсвязывающих петель имеют только ограниченный репертуар доступных конформаций. Каждая каноническая структура может быть охарактеризована углами поворота полипептидного скелета. Таким образом, соответствующие петли в антителах могут иметь очень похожую трехмерную структуру, несмотря на высокую вариабельность аминокислотных последовательно-

стей в большинстве частей петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901; Chothia et al., *Nature*, 1989, 342: 877; Martin and Thornton, *J. Mol. Biol.*, 1996, 263: 800). Кроме того, существует взаимосвязь между принимаемой петлей структурой и окружающими ее аминокислотными последовательностями. Конформация конкретного канонического класса определяется длиной петли и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях внутри петли, а также в пределах консервативного каркаса (т.е., за пределами петли). Таким образом, отнесение к конкретному каноническому классу может быть основано на наличии этих ключевых аминокислотных остатков.

Термин "каноническая структура" может также включать в себя соображения относительно линейной последовательности антитела, например, как каталогизировано Kabat (Kabat et al., в приводившейся выше цитате). Схема (система) нумерации Kabat является широко признанным стандартом нумерации аминокислотных остатков варибельного домена антитела систематическим образом и является предпочтительной схемой, применяемой в данном изобретении, как упоминалось в другом месте данного документа. Дополнительные структурные соображения также могут быть применены для определения канонической структуры антитела. Например, эти различия, не полностью отраженные нумерацией Kabat, могут быть описаны системой нумерации Chothia et al. и/или выявлены другими методами, например, кристаллографией и двух- или трехмерным вычислительным моделированием. Соответственно, данная последовательность антител может быть отнесена к каноническому классу, который позволяет, среди прочего, идентифицировать подходящие последовательности шасси (например, на основе желания включить в библиотеку множество канонических структур). Нумерация Kabat аминокислотных последовательностей антитела, структурные соображения, описанные Chothia et al., в приводившейся выше цитате и их влияние на толкование канонических аспектов структуры антитела описаны в литературе. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны в данной области техники. Обзор структуры антител см. в *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988.

CDR3 легкой цепи и особенно CDR3 тяжелой цепи могут составлять наиболее важные детерминанты связывания с антигеном в варибельных участках легкой и тяжелой цепи. В некоторых конструкциях антител CDR3 тяжелой цепи, по-видимому, составляет основную область контакта между антигеном и антителом. Схемы отбора *in vitro*, в которых варьируют только CDR3, могут быть применены для варьирования связывающих свойств антитела или определения того, какие остатки вносят вклад в связывание с антигеном. Следовательно, CDR3, как правило, является самым большим источником молекулярного разнообразия в связывающем сайте антитела. H3, например, может быть очень коротким, всего два аминокислотных остатка, или содержать более чем 26 аминокислот.

В классическом полноразмерном антителе или иммуноглобулине каждая легкая (L) цепь связана с тяжелой (H) цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две цепи H связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изоформа цепи H. Домен CH, наиболее близкий к VH, обычно обозначается как CH1. Константные ("C") домены непосредственно не принимают участие в связывании с антигеном, но выполняют различные эффекторные функции, такие как антителозависимая, клеточно-опосредованная цитотоксичность и активация комплемента. Участок Fc антитела входит в константные домены тяжелой цепи и, например, способен взаимодействовать с рецепторами Fc, расположенными на клеточной поверхности.

Последовательность генов антител после сборки и соматической мутации значительно варьирует, и, согласно оценкам, такие варьирующие гены кодируют  $10^{10}$  различных молекул антител (*Immunoglobulin Genes*, 2<sup>nd</sup> ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995). Соответственно иммунная система обеспечивает репертуар иммуноглобулинов. Термин "репертуар" относится по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, полученной полностью или частично из по меньшей мере одной последовательности, кодирующей по меньшей мере один иммуноглобулин. Последовательность(и) может(гут) быть получена(ы) путем перегруппировки *in vivo* сегментов тяжелых цепей V, D и J и сегментов легких цепей V и J. В качестве альтернативы, последовательность(и) может(гут) быть получена(ы) из клетки, в ответ на которую происходит перегруппировка, например, стимуляция *in vitro*. В качестве альтернативы, часть или вся последовательность(и) может(гут) быть получена(ы) путем сплайсинга ДНК, синтеза нуклеотидов, мутагенеза и других способов, см., например, патент США 5565332. Репертуар может включать в себя только одну последовательность или может включать в себя множество последовательностей, в том числе в генетически разнообразной коллекции.

Предпочтительная конструкция антитела согласно изобретению также может быть определена как конструкция биспецифического антитела, содержащая первый (предпочтительно человеческий) связывающий домен, который связывается с МЗЛН (MSLN) человека на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с КД3 (CD3) человека на поверхности Т-клетки, причем первый связывающий домен связывается с тем же эпитопом МЗЛН (MSLN), что и антитело, выбранное из группы, состоящей из MS\_1-MS\_8, т.е., антитело, содержащее участок VH, который содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и участок VL, который содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из:

а) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 151, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 152, CDR-

H3, представленного в SEQ ID NO: 153, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 154, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 155 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 156;

b) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 161, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 162, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 163, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 164, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 165 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 166;

c) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 171, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 172, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 173, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 174, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 175 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 176;

d) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 181, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 182, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 183, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 184, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 185 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 186;

e) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 191, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 192, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 193, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 194, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 195 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 196;

f) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 201, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 202, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 203, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 204, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 205 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 206;

g) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 211, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 212, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 213, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 214, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 215 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 216; а также

h) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 221, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 222, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 223, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 224, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 225 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 226.

Связывается ли конструкция антитела с тем же эпитопом МЗЛН (MSLN), что и другая заданная конструкция антитела, можно определить, например, путем картирования эпитопа с химерными или укороченными молекулами-мишенями, например, как описано в данном документе выше и в прилагаемых примерах 1 и 2.

Предпочтительная конструкция антитела согласно изобретению также может быть определена как конструкция биспецифического антитела, содержащая первый (предпочтительно человеческий) связывающий домен, который связывается с МЗЛН (MSLN) человека на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с КДЗ (CD3) человека на поверхности Т-клетки, причем первый связывающий домен конкурирует за связывание с антителом, выбранным из группы, состоящей из MS\_1-MS\_8, т.е., антителом, содержащим участок VH, который содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и участок VL, который содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из описанных выше.

Конкурирует ли конструкция антитела за связывание с другой заданной конструкцией антитела, можно определить в конкурентном анализе, таком как конкурентный ТИФА (ELISA) или конкурентный анализ на основе клеток. Кроме того, можно применять связанные с авидином микрочастицы (шарики). Подобно покрытому авидином планшету ТИФА (ELISA) при взаимодействии с биотинилированным белком каждый из этих шариков может быть применен в качестве субстрата, на котором может быть проведен анализ. Антиген наносится на шарик, который затем предварительно покрывают первым антителом. Добавляют второе антитело и определяют любое дополнительное связывание. Возможные средства для считывания включают проточную цитометрию.

В одном варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит участок VH, выбранный из группы, состоящей из представленных в SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 217 и SEQ ID NO: 227.

В дополнительном варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит участок VL, выбранный из группы, состоящей из представленных в SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 218 и SEQ ID NO: 228.

В другом варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит участок VH и участок VL, выбранные из группы, состоящей из пар участков VH и участков VL, представленных в SEQ ID NO: 157 плюс 158, SEQ ID NO: ID NO: 167 плюс 168, SEQ ID NO: 177 плюс 178, SEQ ID NO: 187 плюс 188, SEQ ID NO: 197 плюс 198, SEQ ID NO: 207 плюс 208, SEQ ID NO: 217 плюс 218 и SEQ ID NO: 227 плюс 228.

В еще одном дополнительном варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит полипептид, выбранный из группы, состоящей из представленных в SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 219 и SEQ ID NO: 229.

Вышеуказанные первые связывающие домены (обозначенные по их CDR, участку VH и участку VL и их комбинациям) характеризуются как связывающие домены, которые связываются с эпитопом МЗЛН

(MSLN), представленным в SEQ ID NO: 231, 232 и 233.

Как используется в данном изобретении, термин "биспецифический" относится к конструкции антитела, которая является "по меньшей мере биспецифической", т.е., она содержит, по меньшей мере, первый связывающий домен и второй связывающий домен, причем первый связывающий домен связывается с одним антигеном или мишенью (в данном изобретении: МЗЛН (MSLN)), а второй связывающий домен связывается с другим антигеном или мишенью (в данном изобретении: КДЗ (CD3)). Соответственно конструкции антител в соответствии с изобретением обладают специфичностью по меньшей мере в отношении двух разных антигенов или мишеней. Кроме того, термин "конструкция биспецифического антитела" по изобретению включает конструкции полиспецифических антител, такие как конструкции триспецифических антител, притом, что последние содержат три связывающих домена, или конструкции, обладающие более чем тремя (например, четыремя, пятью...) видами специфичности.

Учитывая, что конструкции антител в соответствии с изобретением являются (по меньшей мере) биспецифическими, они не встречаются в природе, и они заметно отличаются от естественных продуктов. Таким образом, "биспецифическая" конструкция антитела или иммуноглобулина является искусственным гибридным антителом или иммуноглобулином, содержащим по меньшей мере два различных сайта связывания с разной специфичностью. Биспецифические конструкции антител могут быть получены различными способами, включая слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов (См., например, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990)).

По меньшей мере два связывающих домена и вариабельных домена конструкции антитела по данному изобретению могут содержать или не содержать пептидных линкеров (спейсерные пептиды). Термин "пептидный линкер" в соответствии с данным изобретением включает в себя аминокислотную последовательность, посредством которой аминокислотные последовательности одного (вариабельного и/или связывающего) домена и другого (вариабельного и/или связывающего) домена в конструкции антитела по изобретению связаны друг с другом. Существенным техническим признаком такого пептидного линкера является то, что он не обладает полимеризационной активностью. В числе подходящих пептидных линкеров находятся те, которые описаны в патентах США 4751180 и 4935233 или WO 88/09344. Кроме того, пептидные линкеры могут быть применены для присоединения других доменов или модулей или участков (например, доменов, удлиняющих период полувыведения) к конструкции антитела по изобретению.

В том случае, если используется линкер, длина и последовательность этого линкера предпочтительно являются достаточными, чтобы гарантировать, что каждый из первого и второго доменов сможет независимо друг от друга сохранять свою отличающуюся специфичность связывания. Для пептидных линкеров, которые соединяют по меньшей мере два связывающих домена (или два вариабельных домена) в конструкции антитела по изобретению, предпочтительными являются указанные пептидные линкеры, которые содержат только несколько аминокислотных остатков, например, 12 аминокислотных остатков или менее. Таким образом, предпочтительными являются пептидные линкеры из 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислотных остатков. Предполагаемый пептидный линкер с менее чем 5 аминокислотами содержит 4, 3, 2 или одну аминокислоту, причем богатые Gly линкеры являются предпочтительными. Особенно предпочтительной "единственной" аминокислотой в контексте указанного "пептидного линкера" является Gly. Соответственно указанный пептидный линкер может состоять из одной аминокислоты Gly. Другой предпочтительный вариант пептидного линкера характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т.е., Gly<sub>4</sub>Ser (SEQ ID NO: 1), или их полимерами, т.е., (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>x</sub>, где x представляет собой целое число 1 или больше (например, 2 или 3). Предпочтительные линкеры представлены в SEQ ID NO: 1-9. Характеристики указанного пептидного линкера, которые включают в себя отсутствие содействия образованию вторичных структур, известны в данной области техники и описаны, например, в Dall'Acqua et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) и Raag and Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Предпочтительными являются пептидные линкеры, которые, кроме того, не способствуют образованию каких-либо вторичных структур. Связывание указанных доменов друг с другом может быть обеспечено, например, при помощи генной инженерии, как описано в примерах. Способы получения слитых и функционально связанных биспецифических одноцепочечные конструкции и экспрессия их в клетках млекопитающих или бактерий хорошо известны в данной области техники (например, WO 99/54440 или Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).

Как описано выше, в изобретении предложен предпочтительный вариант осуществления изобретения, в котором конструкция антитела находится в формате, выбранном из группы, состоящей из (scFv)<sub>2</sub>, scFv-однодоменного mAb, диател и олигомеров любого из указанных форматов.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления изобретения и как описано в прилагаемых примерах, конструкция антитела по изобретению представляет собой "биспецифическую одноцепочечную конструкцию антитела", более предпочтительно биспецифический "одноцепочечный Fv" (scFv). Хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно объединить с применением рекомбинантных методов, при помощи синтетического линкера, как описано выше, что позволяет превратить их в одну белковую цепь в которой пары участков VL и VH образуют

одновалентную молекулу (см., например, Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Эти фрагменты антител получают с применением обычных методов, известных специалистам в данной области техники, и оценивают функцию фрагментов таким же образом, как в случае цельных или полно-размерных антител. Одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) является, следовательно, слитым белком вариабельного участка тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) иммуноглобулинов, обычно связанного коротким линкерным пептидом длиной от около 10 до около 25 аминокислот, предпочтительно приблизительно от 15 до 20 аминокислот. Линкер обычно богат глицином для обеспечения гибкости, а также серином или треонином для обеспечения растворимости и может соединять N-конец VH с C-концом VL или наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных участков и введение линкера.

Биспецифические одноцепочечные молекулы известны в данной области техники и описаны в WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kirguyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Описаны технологии получения одноцепочечных антител (см., среди прочего, патент США 4946778, Kontermann and Dübel (2010), в приводившейся выше цитате, и Little (2009), в приводившейся выше цитате) могут быть адаптированы для получения конструкций одноцепочечных антител, специфически распознающих выбранную(ые) мишень(и).

Бивалентные (также называемые двухвалентными) или биспецифические одноцепочечные вариабельные фрагменты (би-scFv или ди-scFv, имеющие формат (scFv)<sub>2</sub>), могут быть сконструированы путем связывания двух молекул scFv (например, при помощи линкеров, как описано в данном документе выше). Если эти две молекулы scFv обладают одинаковой специфичностью связывания, то полученная молекула (scFv)<sub>2</sub> предпочтительно будет называться двухвалентной (т.е., в ней присутствуют две валентности для одного и того же целевого эпитопа). Если две молекулы scFv обладают разной специфичностью связывания, то полученная молекула (scFv)<sub>2</sub> предпочтительно будет называться биспецифической. Связывание может быть осуществлено путем создания одной пептидной цепи с двумя участками VH и двумя участками VL, с получением тандемных scFv (см., например, Kufer P. et al., (2004) Trends in Biotechnology 22(5): 238-244). Другой возможностью является создание молекул scFv с линкерными пептидами, слишком короткими для свертывания двух вариабельных областей со сближением (например, около пяти аминокислот), что заставляет scFv димеризоваться. Этот тип известен как диатела (см., например, Hollinger, Philipp et al. (July 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (14): 6444-8).

В соответствии с другим предпочтительным вариантом конструкции антитела по изобретению тяжелая цепь (VH) и легкая цепь (VL) связывающего домена, связывающаяся с целевым антигеном МЗЛН (MSLN) или КДЗ (CD3), непосредственно не связаны посредством описанного выше пептидного линкера, как описано выше, а связывающий домен образуется в результате образования биспецифической молекулы, как описано для диатела. Таким образом, цепь VH связывающего домена против КДЗ (CD3) может быть слита с VL связывающего домена против МЗЛН (MSLN) посредством пептидного линкера, тогда как цепь VH связывающего домена против МЗЛН (MSLN) слита с VL связывающего домена против КДЗ (CD3) посредством такого пептидного линкера.

Однодоменные антитела содержат только один (мономерный) вариабельный домен антитела, который способен избирательно связываться с определенным антигеном независимо от других V участков или доменов. Первые однодоменные антитела были сконструированы из антител с тяжелой цепью, найденных у верблюдовых, и они называются V<sub>H</sub>H фрагментами. У хрящевых рыб также есть антитела тяжелой цепи (IgNAR), из которых могут быть получены однодоменные антитела, называемые фрагментами V<sub>NAR</sub>. Альтернативный подход заключается в расщеплении димерных вариабельных доменов из обычных иммуноглобулинов, например, из организма человека или грызунов, на мономеры с получением таким образом VH или VL в виде однодоменного Ab. Хотя в настоящее время большинство исследований в области однодоменных антител основаны на вариабельных доменах тяжелой цепи, было показано, что наночастицы, полученные из легких цепей, специфически связываются с целевыми эпитопами. Примеры однодоменных антител называются sdAb, наночастицами или антителами с одним вариабельным доменом.

Таким образом, (однодоменное mAb)<sub>2</sub> представляет собой конструкцию моноклонального антитела, состоящую из (по меньшей мере) двух моноклональных однодоменных антител, которые индивидуально выбраны из группы, включающей VH, VL, V<sub>H</sub>H и V<sub>NAR</sub>. Линкер предпочтительно имеет форму пептидного линкера. Аналогично "scFv-однодоменное mAb" представляет собой конструкцию моноклонального антитела, состоящую из, по меньшей мере, одного однодоменного антитела, как описано выше, и одной молекулы scFv, как описано выше. Снова линкер предпочтительно имеет форму пептидного линкера.

Дополнительно предусмотрено, что данное изобретение относится к конструкции биспецифического антитела, содержащей первый связывающий домен, который связывается с МЗЛН (MSLN) человека на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с КДЗ (CD3) человека на поверхности Т-клетки, причем первый связывающий домен связывается с эпитопом МЗЛН



(MSLN), находящимся в пределах участка, представленного SEQ ID NO: 245 (кластер 2 плюс 3).

Соответственно в дополнительном аспекте изобретения первый связывающий домен конструкции биспецифического антитела содержит участок VH, который содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и участок VL, который содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из:

а) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 161, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 162, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 163, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 164, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 165 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 166;

б) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 171, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 172, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 173, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 174, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 175 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 176;

в) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 181, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 182, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 183, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 184, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 185 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 186;

г) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 191, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 192, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 193, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 194, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 195 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 196;

е) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 201, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 202, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 203, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 204, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 205 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 206.

В одном варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит участок VH, выбранный из группы, состоящей из представленных в SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 197 и SEQ ID NO: 207.

В следующем варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит область VL, выбранную из группы, состоящей из представленных в SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 198 и SEQ ID NO: 208.

В другом варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит область VH и область VL, выбранную из группы, состоящей из пар VH-области и области VL, представленного в SEQ ID NO: 167 плюс 168, SEQ ID NO: ID NO: 177 плюс 178, SEQ ID NO: 187 плюс 188, SEQ ID NO: 197 плюс 198 и SEQ ID NO: 207 плюс 208.

В следующем варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит полипептид, выбранный из группы, состоящей из представленных в SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 199 и SEQ ID NO: 209.

Кроме того, данное изобретение относится к конструкции биспецифического антитела, содержащей первый связывающий домен, который связывается с МЗЛН (MSLN) человека на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, причем первый связывающий домен связывается с эпитопом МЗЛН (MSLN), находящимся в пределах участка, представленного в SEQ ID NO: 244 (кластер 1 плюс 2).

Соответственно, в следующем аспекте изобретения первый связывающий домен конструкции биспецифического антитела содержит участок VH, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и участок VL, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, следующим образом:

(а) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 151, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 152, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 153, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 154, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 155 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 156; или

(б) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 221, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 222, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 223, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 224, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 225 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 226.

В одном варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит участок VH, представленный в SEQ ID NO: 157 или SEQ ID NO: 227.

В следующем варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит участок VL, представленный в SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 228.

В другом варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит участок VH и участок VL, выбранные из группы, состоящей из пар участка VH и участка VL, представленных в SEQ ID NO: 157 плюс 158, и SEQ ID NO: 227 плюс 228.

В следующем варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит полипептид, выбранный из группы, состоящей из представленных в SEQ ID NO: 159 и SEQ ID NO: 229.

Кроме того, в данном изобретении предложена конструкция биспецифического антитела, содержащая первый связывающий домен, который связывается с МЗЛН (MSLN) человека на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, причем первый связывающий домен связывается с эпитопом МЗЛН (MSLN), находящимся в пределах участка, представленного в SEQ ID NO: 241 (кластер 4).

Соответственно в дополнительном аспекте изобретения первый связывающий домен конструкции

биспецифического антитела содержит участок VH, содержащий CDR-H1, представленный в SEQ ID NO: 211, CDR-H2, представленный в SEQ ID NO: 212, CDR-H3, представленный в SEQ ID NO: 213, CDR-L1, представленный в SEQ ID NO: 214, CDR-L2, представленный в SEQ ID NO: 215 и CDR-L3, представленный в SEQ ID NO: 216.

В одном варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит участок VH, представленный в SEQ ID NO: 217.

В следующем варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит участок VL, представленный в SEQ ID NO: 218.

В другом варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит участок VH и участок VL, представленные в SEQ ID NO: 217 плюс 218.

В следующем варианте осуществления изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит полипептид, представленный в SEQ ID NO: 219.

Кроме того, другая предпочтительная конструкция антитела в соответствии с изобретением может быть определена как конструкция биспецифического антитела, содержащая первый (предпочтительно человеческий) связывающий домен, который связывается с МЗЛН (MSLN) человека на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, причем первый связывающий участок конкурирует за связывание с антителом, выбранным из группы, состоящей из MS-3, MS-4 и MS-5, т.е., антителом, содержащим участок VH, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и участок VL, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из описанных выше.

Т-клетки или Т-лимфоциты представляют собой вид лимфоцитов (которые сами по себе являются видом белых кровяных клеток), который играет центральную роль в клеточно-опосредованном иммунитете. Существует несколько подмножеств Т-клеток, каждое из которых выполняет собственную функцию. Т-клетки можно отличить от других лимфоцитов, таких как В-клетки и НК (NK)-клетки, по наличию Т-клеточного рецептора, ТКР (TCR) на поверхности клетки. ТКР (TCR) отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости, ГКГ (MHC), и состоит из двух различных белковых цепей. В 95% Т-клеток ТКР (TCR) состоит из альфа ( $\alpha$ ) и бета ( $\beta$ ) цепей. При взаимодействии ТКР (TCR) с антигенным пептидом и ГКГ (MHC) (комплекс пептида/ГКГ (MHC)), Т-лимфоцит активизируется посредством ряда биохимических событий, опосредуемых связанными ферментами, корецепторами, специализированными адаптивными молекулами и активируемыми или высвобождаемыми транскрипционными факторами.

Рецепторный комплекс КДЗ (CD3) представляет собой белковый комплекс и состоит из четырех цепей. У млекопитающих комплекс содержит цепь (CD3) $\gamma$  (гамма), цепь (CD3) $\delta$  (дельта) и две цепи (CD3) $\epsilon$  (ипсилон). Эти цепи связываются с Т-клеточным рецептором, ТКР (TCR) и так называемой  $\zeta$  (дзета) цепью с образованием комплекса Т-клеточного рецептора-КДЗ (CD3) и генерируют сигнал активации в Т-лимфоцитах. Цепи (CD3) $\gamma$  (гамма), (CD3) $\delta$  (дельта) и (CD3) $\epsilon$  (ипсилон) представляют собой белки клеточной поверхности, в высокой степени родственные суперсемейству иммуноглобулина, содержащему один внеклеточный домен иммуноглобулина.

Внутриклеточные хвосты молекул КДЗ (CD3) содержат один консервативный мотив, известный как мотив активации иммунорецептора на основе тирозина или сокращенно МАИТ (ITAM), который необходим для способности ТКР (TCR) к проведению сигнала. Молекула CD3 ипсилон представляет собой полипептид, который у человека кодируется геном CD3E, находящемся на хромосоме 11. Наиболее предпочтительный эпитоп CD3 ипсилон содержится в пределах аминокислотных остатков 1-27 внеклеточного домена CD3 ипсилон человека.

Переадресованный лизис клеток-мишеней посредством рекрутинга Т-клеток при помощи конструкции полиспецифического, по меньшей мере биспецифического антитела включает в себя образование цитолитического синапса и доставку перфорина и гранзимов. Задействованные Т-клетки способны к серийному лизису клеток-мишеней и на них не влияют механизмы ускользания от иммунного ответа, препятствующие процессированию и презентации пептидного антигена или клональной дифференцировке Т-клеток (см., например, WO 2007/042261).

Цитотоксичность, опосредованная конструкциями биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КДЗ (CD3), может быть измерена различными способами (см. Пример 5). Эффекторными клетками могут быть, например, стимулированные обогатенные (человеческие) CD8-позитивные Т-клетки или нестимулированные (человеческие) мононуклеарные клетки периферической крови, МКПК (PBMC). Если клетки-мишени получены от макака или экспрессируются или трансфектированы при помощи МЗЛН (MSLN) макака, то эффекторные клетки также должны быть получены от макака, например, линия Т-клеток макака, например, 4119LnPx. Клетки-мишени должны экспрессировать (по меньшей мере, внеклеточный домен) МЗЛН (MSLN), например, МЗЛН (MSLN) человека или макака. Клетки-мишени могут быть клеточной линией (такой как ЯКХ (CHO)), которая стабильно или временно трансфектирована МЗЛН (MSLN), например, МЗЛН (MSLN) человека или макака. В качестве альтернативы, клетки-мишени могут представлять собой линию клеток, естественным образом экспрессирующих МЗЛН

(MSLN), такую как клеточная линия человека OVCAR-8. Как правило, ожидается, что значения  $EC_{50}$  будут ниже для линий клеток-мишеней, экспрессирующих более высокие уровни МЗЛН (MSLN) на поверхности клетки. Соотношение эффекторов и клеток-мишеней (Э:М) обычно составляет около 10:1, но может также варьировать. Цитотоксическую активность конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КДЗ (CD3) можно измерить в анализе высвобождения хрома-51 (время инкубации около 18 ч) или в анализе цитотоксичности на основе СКАФ (FACS) (время инкубации около 48 ч). Изменения времени инкубации в анализе (цитотоксическая реакция) также возможны. Другие методы измерения цитотоксичности хорошо известны специалисту в данной области техники и включают в себя колориметрические анализы для оценки метаболической активности клеток МТТ или МТС, анализы на основе АТФ, включая биоллюминесцентные анализы, анализ с сульфородаминоном В, СРВ (SRB), анализ с реагентом клеточной пролиферации WST-1 (анализ WST), клоногенный анализ и технологию электрического клетки с субстратом импеданса, ЭКСИ (ECIS).

Цитотоксическую активность, опосредованную конструкциями биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КДЗ (CD3) по данному изобретению, предпочтительно измеряют в анализе цитотоксичности на клеточной основе. Кроме того, ее можно измерить в анализе высвобождения хрома-51. Ее выражают как значение  $EC_{50}$ , что соответствует концентрации, обеспечивающей 50% от максимальной эффективной концентрации (концентрация конструкции антитела, которая индуцирует цитотоксический ответ с половинной интенсивностью между фоновым значением и максимумом). Предпочтительно значение  $EC_{50}$  для конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КДЗ (CD3) составляет меньше или равно 5000 пМ или меньше или равно 4000 пМ, более предпочтительно меньше или равно 3000 пМ или меньше или равно 2000 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 1000 пМ или меньше или равно 500 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 400 пМ или меньше или равно 300 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 200 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 100 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 50 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 20 пМ или меньше или равно 10 пМ и наиболее предпочтительно меньше или равно 5 пМ.

Вышеуказанные значения  $EC_{50}$  могут быть измерены в разных анализах. Специалист в данной области техники будет понимать, что ожидается меньшее значение  $EC_{50}$ , если стимулированные/обогащенные CD8+ Т-клетки применяются в качестве эффекторных клеток, по сравнению с нестимулированными МКПК (PBMC). Кроме того, можно ожидать, что значение  $EC_{50}$  будет ниже, если клетки-мишени экспрессируют большее количество целевого антигена по сравнению с крысой с низким уровнем экспрессии мишени. Например, если стимулированные/обогащенные CD8+ Т-клетки человека применяют в качестве эффекторных клеток (и трансфектированные МЗЛН (MSLN) клетки, такие как клетки яичника китайского хомяка, ЯКХ (CHO) или МЗЛН (MSLN)-положительную клеточную линию человека OVCAR-8 применяют в качестве клеток-мишеней), то значение  $EC_{50}$  конструкции биспецифического антитела против МЗЛН (MSLN) x КДЗ (CD3) предпочтительно составляет меньше или равно 1000 пМ, более предпочтительно меньше или равно 500 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 250 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 100 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 50 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 10 пМ и наиболее предпочтительно меньше или равно 5 пМ. Если МКПК (PBMC) человека применяют в качестве эффекторных клеток, то значение  $EC_{50}$  конструкции биспецифического антитела против МЗЛН (MSLN) x КДЗ (CD3) предпочтительно составляет меньше или равно 5000 пМ или меньше или равно 4000 пМ (в частности, если клетки-мишени представляют собой МЗЛН (MSLN)-положительную клеточную линию человека OVCAR-8), более предпочтительно меньше или равно 2000 пМ (в частности, если клетки-мишени представляют собой трансфектированные МЗЛН (MSLN) клетки, такие как клетки ЯКХ (CHO)), более предпочтительно меньше или равно 1000 пМ или меньше или равно 500 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 200 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 150 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 100 пМ и наиболее предпочтительно меньше или равно 50 пМ или ниже. Если линия Т-клеток макака, такая как LnPx4119, применяется в качестве эффекторных клеток, а клетки, трансфектированные МЗЛН (MSLN) макака, такие как клетки ЯКХ (CHO), применяются в качестве линии клеток-мишеней, то значение  $EC_{50}$  конструкции биспецифического антитела против МЗЛН (MSLN) x КДЗ (CD3) предпочтительно составляет меньше или равно 2000 пМ или меньше или равно 1500 пМ, более предпочтительно меньше или равно 1000 пМ или меньше или равно 500 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 300 пМ или меньше или равно 250 пМ, еще более предпочтительно меньше или равно 100 пМ и наиболее предпочтительно меньше или равно 50 пМ.

Предпочтительно конструкции биспецифического антитела против МЗЛН (MSLN) x КДЗ (CD3) по данному изобретению не вызывают/не опосредуют лизис или по существу не вызывают/не опосредуют лизис МЗЛН (MSLN)-отрицательных клеток, таких как клетки ЯКХ (CHO). Термин "не вызывать лизиса", "по существу не вызывать лизиса", "не опосредовать лизис" или "по существу не опосредовать лизис" означает, что конструкция антитела по данному изобретению не вызывает или не опосредует лизис более чем 30%, предпочтительно не более чем 20%, более предпочтительно не более чем 10%, особенно предпочтительно не более чем 9, 8, 7, 6 или 5% МЗЛН (MSLN)-отрицательных клеток, причем лизис

МЗЛН (MSLN)-положительной клеточной линии человека OVCAR-8 (см. выше) принимается за 100%. Это обычно применимо к концентрациям конструкции антитела до 500 нМ. Специалисту в данной области техники известно, как измерить лизис клеток без ненужного экспериментирования. Кроме того, в данном документе приведены конкретные инструкции по измерению лизиса клеток.

Различие в цитотоксической активности между мономерной и димерной изоформами отдельных конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КДЗ (CD3) называется "зазором активности". Такой зазор активности может быть, например, вычислен как соотношение между значениями EC<sub>50</sub> мономерной и димерной форм молекул (см. Пример 5.8). Зазоры активности конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КДЗ (CD3) по данному изобретению предпочтительно составляют меньше или равно 5, более предпочтительно меньше или равно 4, еще более предпочтительно меньше или равно 3, еще более предпочтительно меньше или равно 2, далее предпочтительно меньше или равно 1 и наиболее предпочтительно меньше или равно 0,3.

Первый и/или второй (или любой другой) связывающий(е) домен(ы) конструкции антитела по изобретению предпочтительно обладает(ют) перекрестно-видовой специфичностью в отношении членов порядка приматов млекопитающих. Обладающие перекрестно-видовой специфичностью КДЗ (CD3)-связывающие домены, например, описаны в WO 2008/119567. Согласно одному варианту осуществления изобретения первый и/или второй связывающий домен в дополнение к связыванию с МЗЛН (MSLN) человека и КДЗ (CD3) человека, соответственно, будет также связываться с МЗЛН (MSLN)/КДЗ (CD3) приматов, включая (но не ограничиваясь этим) приматов Нового Света (таких как *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* или *Saimiri sciureus*), приматов Старого Света (таких как бабуины и макаки), гиббонов, орангутангов и представителей семейства гоминид, не относящихся к человеку. Предполагается, что первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению, который связывается с МЗЛН (MSLN) человека на поверхности клетки-мишени, также связывается по меньшей мере с МЗЛН (MSLN) макака, и/или второй связывающий домен, который связывается с КДЗ (CD3) человека на поверхности Т-клетки, также связывает по меньшей мере с КДЗ (CD3) макака. Предпочтительным макаком является *Macaca fascicularis*. Кроме того, включен *Macaca mulatta* (резус).

В одном аспекте изобретения первый связывающий домен связывается с МЗЛН (MSLN) человека и дополнительно связывается с МЗЛН (MSLN) макака, таким как МЗЛН (MSLN) *Macaca fascicularis* и более предпочтительно, с МЗЛН (MSLN), экспрессирующимся на поверхности клеток макака. Предпочтительный МЗЛН (MSLN) *Macaca fascicularis* представлен в SEQ ID NO: 234. Аффинность первого связывающего домена в отношении МЗЛН (MSLN) макака предпочтительно составляет меньше или равно 15 нМ, более предпочтительно меньше или равно 10 нМ, еще более предпочтительно меньше или равно 5 нМ, еще более предпочтительно меньше или равно 1 нМ, еще более предпочтительно меньше или равно 0,5 нМ, еще более предпочтительно меньше или равно 0,1 нМ и наиболее предпочтительно меньше или равно 0,05 нМ или даже меньше или равно 0,01 нМ.

Предпочтительно зазор аффинности для конструкций антител в соответствии с изобретением для связывания МЗЛН (MSLN) макака и МЗЛН (MSLN) [ма МЗЛН (MSLN):hu МЗЛН (MSLN)] (по данным, например, анализа Biacore или Scatchard) составляет менее чем 100, предпочтительно менее чем 20, более предпочтительно менее чем 15, далее предпочтительно менее чем 10, даже более предпочтительно менее чем 8, более предпочтительно менее чем 6 и наиболее предпочтительно менее чем 2. Предпочтительные диапазоны зазора аффинности конструкций антител в соответствии с данным изобретением для связывания с МЗЛН (MSLN) макака против МЗЛН (MSLN) человека составляют от 0,1 до 20, более предпочтительно от 0,2 до 10, еще более предпочтительно от 0,3 до 6, еще более предпочтительно от 0,5 до 3 или от 0,5 до 2,5 и наиболее предпочтительно от 0,5 до 2 или от 0,6 до 2 (см. Пример 3).

Таким образом, предпочтительная конструкция антитела в соответствии с данным изобретением содержит агент связывания с МЗЛН (MSLN) для эпитопного кластера 2 плюс 3, аффинный зазор для которого, как было показано, составляет меньше или равно 15. Кроме того, предпочтительной является конструкция антитела, содержащая агент связывания с МЗЛН (MSLN) для эпитопного кластера 2 плюс 3 с аффинным зазором меньше или равно 6, такой как конструкции биспецифических антител на основе MS-3, MS-4 или MS-5.

В одном варианте конструкции антитела по изобретению второй связывающий домен связывается с CD3 ипсилон человека и с CD3 ипсилон *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* или *Saimiri sciureus*. Предпочтительно, второй связывающий домен связывается с внеклеточным эпитопом этих цепей CD3 ипсилон. Также предполагается, что второй связывающий домен связывается с внеклеточным эпитопом цепи CD3 ипсилон человека и *Macaca*. Наиболее предпочтительный эпитоп CD3 ипсилон содержится в пределах аминокислотных остатков 1-27 внеклеточного домена CD3 ипсилон человека. Даже более конкретно эпитоп содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность Gln-Asp-Gly-Asn-Glu. *Callithrix jacchus* и *Saguinus oedipus* оба являются приматами Нового Света, принадлежащими к семейству Callitrichidae, тогда как *Saimiri sciureus* является приматом Нового Света, принадлежащим к семейству Cebidae.

Особенно предпочтительно в конструкции антитела по данному изобретению второй связывающий домен, который связывается с КДЗ (CD3) человека на поверхности Т-клетки, содержит участок VL, ко-

торый содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из:

(a) CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 27 WO 2008/119567, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 28 WO 2008/119567 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 29 WO 2008/119567;

(b) CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 117 WO 2008/119567, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 118 WO 2008/119567 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 119 WO 2008/119567; и

(c) CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 153 WO 2008/119567, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 154 WO 2008/119567 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 155 WO 2008/119567.

В альтернативном предпочтительном варианте конструкции антитела по данному изобретению второй связывающий домен, который связывается с КД3 (CD3) человека на поверхности Т-клетки, содержит участок VH, который содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, выбранные из:

(a) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 12 WO 2008/119567, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 13 WO 2008/119567 и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 14 WO 2008/119567;

(b) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 30 WO 2008/119567, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 31 WO 2008/119567 и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 32 WO 2008/119567;

(c) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 48 WO 2008/119567, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 49 WO 2008/119567 и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 50 WO 2008/119567;

(d) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 66 WO 2008/119567, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 67 WO 2008/119567 и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 68 WO 2008/119567;

(e) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 84 WO 2008/119567, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 85 WO 2008/119567 и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 86 WO 2008/119567;

(f) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 102 WO 2008/119567, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 103 WO 2008/119567 и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 104 WO 2008/119567;

(g) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 120 WO 2008/119567, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 121 WO 2008/119567 и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 122 WO 2008/119567;

(h) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 138 WO 2008/119567, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 139 WO 2008/119567 и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 140 WO 2008/119567;

(i) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 156 WO 2008/119567, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 157 WO 2008/119567 и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 158 WO 2008/119567; и

(j) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 174 WO 2008/119567, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 175 WO 2008/119567 и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 176 WO 2008/119567.

Кроме того в конструкциях антитела по данному изобретению второй связывающий домен, который связывается с КД3 (CD3) человека на поверхности Т-клетки, предпочтительно содержит участок VL, выбранный из группы, состоящей из участка VL, представленного в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 99 и SEQ ID NO: 102 (см. также SEQ ID NO: 35, 39, 125, 129, 161 или 165 WO 2008/119567).

В качестве альтернативы, второй связывающий домен, который связывается с КД3 (CD3) человека на поверхности Т-клетки, предпочтительно содержит участок VH, выбранный из группы, состоящей из участка VH, представленного в SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 101 (см. также SEQ ID NO: 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 или 181 WO 2008/119567).

Более предпочтительно конструкция антитела по данному изобретению характеризуется вторым связывающим доменом, который связывается с КД3 (CD3) человека на поверхности Т-клетки, содержащим участок VL и участок VH, выбранные из группы, состоящей из:

(a) участка VL, представленного в SEQ ID NO: 17 или 21 WO 2008/119567, и участка VH, представленного в SEQ ID NO: 15 или 19 WO 2008/119567;

(b) участка VL, представленного в SEQ ID NO: 35 или 39 WO 2008/119567, и участка VH, представленного в SEQ ID NO: 33 или 37 WO 2008/119567;

(c) участка VL, представленного в SEQ ID NO: 53 или 57 WO 2008/119567, и участка VH, представленного в SEQ ID NO: 51 или 55 WO 2008/119567;

(d) участка VL, представленного в SEQ ID NO: 71 или 75 WO 2008/119567, и участка VH, представленного в SEQ ID NO: 69 или 73 WO 2008/119567;

(e) участка VL, представленного в SEQ ID NO: 89 или 93 WO 2008/119567, и участка VH, представленного в SEQ ID NO: 87 или 91 WO 2008/119567;

(f) участка VL, представленного в SEQ ID NO: 107 или 111 WO 2008/119567, и участка VH, представленного в SEQ ID NO: 105 или 109 WO 2008/119567;

(g) участка VL, представленного в SEQ ID NO: 125 или 129 WO 2008/119567, и участка VH, представленного в SEQ ID NO: 123 или 127 WO 2008/119567;

(h) участка VL, представленного в SEQ ID NO: 143 или 147 WO 2008/119567, и участка VH, представленного в SEQ ID NO: 141 или 145 WO 2008/119567;

(i) участка VL, представленного в SEQ ID NO: 161 или 165 WO 2008/119567, и участка VH, пред-

ставленного в SEQ ID NO: 159 или 163 WO 2008/119567; и

(j) участка VL, представленного в SEQ ID NO: 179 или 183 WO 2008/119567, и участка VH, представленного в SEQ ID NO: 177 или 181 WO 2008/119567.

В связи с конструкцией антитела по данному изобретению дополнительно предпочтительным является второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, содержащий участок VL, представленный SEQ ID NO: 102, и участок VH, представленный SEQ ID NO: 101.

Согласно предпочтительному варианту конструкции антитела по данному изобретению связывающие домены и, в частности, второй связывающий домен (который связывается с КДЗ (CD3) человека на поверхности Т-клетки) имеют следующий формат: пары VH-участков и VL-участков находятся в формате одноцепочечного антитела (scFv). Участки VH и VL расположены в порядке VH-VL или VL-VH. Предпочтительно VH-участок расположен на N-конце линкерной последовательности, а VL-участок расположен на C-конце линкерной последовательности.

Предпочтительный вариант описанной выше конструкции антитела по данному изобретению характеризуется вторым связывающим доменом, который связывается с КДЗ (CD3) человека на поверхности Т-клетки, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 103 (см. также SEQ ID NO 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 или 187 WO 2008/119567).

Кроме того, предполагается, что конструкция антитела по изобретению, помимо своей функции связывания с молекулами-мишенями МЗЛН (MSLN) и КДЗ (CD3), выполняет еще одну функцию. В этом формате конструкция антитела действует как трехфункциональная или многофункциональная конструкция антитела путем нацеливания на клетки-мишени посредством связывания с МЗЛН (MSLN), опосредующую активность цитотоксических Т-клеток посредством связывания с КДЗ (CD3) и обеспечивающую дополнительную функцию, например, посредством полностью функционального константного домена Fc, опосредующего антителозависимую клеточную цитотоксичность путем рекрутинга эффекторных клеток, таких как природные клетки-киллеры, ПК (NK)-клетки, метки (флуоресцентная и т.д.), терапевтического агента, такого как токсин или радионуклид, и/или средств для увеличения периода полувыведения из сыворотки и т.д.

Примеры способов продления периода полувыведения из сыворотки конструкций антител по изобретению включают в себя пептиды, белки или белковые домены, которые слиты или иным образом присоединены к конструкциям антител. Группа пептидов, белков или белковых доменов включает в себя пептиды, связывающиеся с другими белками с предпочтительным фармакокинетическим профилем в организме человека, такими как сывороточный альбумин (см. WO 2009/127691). Альтернативная концепция таких пептидов, увеличивающих период полувыведения, включает в себя пептиды, связывающиеся с рецептором Fc новорожденных (FcRn, см. WO 2007/098420), которые также можно применять в конструкциях по данному изобретению. Концепция присоединения более крупных белковых доменов или полноразмерных белков включает в себя, например, слияние человеческого сывороточного альбумина, вариантов или мутантов человеческого сывороточного альбумина (см. WO 2011/051489, WO 2012/059486, WO 2012/150319, WO 2013/135896, WO 2014/072481, WO 2013/075066) или их доменов, а также слияние константного участка иммуноглобулинов (доменов Fc) и их вариантов. Такие варианты доменов Fc могут быть оптимизированы/модифицированы для обеспечения желаемого спаривания димеров или мультимеров, для устранения связывания с рецептором Fc (например, рецептором Fcγ) или по другим причинам. Еще одной концепцией, известной в данной области техники для увеличения периода полувыведения белковых соединений небольшого размера из организма человека, является пегилирование этих соединений, таких как конструкция антитела по данному изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения конструкция антитела по изобретению описывается следующим образом:

(а) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 219 и SEQ ID NO: 229;

пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-9; а также

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 103; а также

необязательно метку His, такую как представлена в SEQ ID NO 10;

(b) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 219 и SEQ ID NO: 229;

пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, со-



SEQ ID NO: 219 и SEQ ID NO: 229;

пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-9; а также

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 103; а также

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 144; а также

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 145;

(g) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 219 и SEQ ID NO: 229; а также

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 146; и

полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 103; а также

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 147;

(h) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 219 и SEQ ID NO: 229; а также

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 148; и

полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 103; а также

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 149;

или

(i) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 219 и SEQ ID NO: 229;

пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-9; а также

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 103; а также

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, изображенную в SEQ ID NO: 150.

Как описано выше, несколько предпочтительных конструкций антител по изобретению модифицированы путем слияния с другим фрагментом, таким как альбумин или варианты альбумина. Если эти химерные конструкции характеризуются такими свойствами, в частности, аффинностью к мишени или цитотоксической активностью, специалист в данной области техники будет понимать, что подобные слитые конструкции или немодифицированные конструкции биспецифических антител могут обладать сходными (или даже лучшими) свойствами. Например, если конструкция биспецифического антитела, слитая с альбумином, обладает значительной или желательной цитотоксической активностью или аффинностью к мишени, можно ожидать, такая же/сходная или даже более высокая цитотоксическая активность/аффинность к мишени будет наблюдаться для конструкции без альбумина.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления изобретения конструкция биспецифического антитела по изобретению содержит (в дополнение к двум связывающим доменам) третий домен, который содержит два полипептидных мономера, каждый из которых содержит шарнир, CH2 и домен CH3, причем указанные два полипептида (или полипептидные мономеры) слиты друг с другом при помощи пептидного линкера. Предпочтительно указанный третий домен содержит в порядке от N-к С-концу: шарнир-CH2-CH3-линкер-шарнир-CH2-CH3.

Предпочтительные аминокислотные последовательности для указанного третьего домена представлены в SEQ ID NO: 260-267. Каждый из указанных двух полипептидных мономеров предпочтительно имеет аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 252-259, или которая по меньшей мере на 90% идентична этим последовательностям. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения первый и второй связывающие домены конструкции биспецифического антитела по изобретению слиты с третьим доменом посредством пептидного линкера, который, например, выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.



В соответствии с данным изобретением "шарнир" представляет собой шарнирный участок IgG. Этот участок может быть идентифицирован по аналогии с применением нумерации Kabat, см. положения Kabat 223-243. В соответствии с вышеизложенным, минимальное требование для "шарнира" представляет собой аминокислотные остатки, соответствующие участку последовательности IgG<sub>1</sub> с D231 по P243 в соответствии с нумерацией Kabat. Термины CH2 и CH3 относятся к константным участкам тяжелой цепи иммуноглобулина 2 и 3. Эти участки также можно идентифицировать по аналогии с применением нумерации Kabat, см. положения Kabat 244-360 для CH2 и положения Kabat 361-478 для CH3. Подразумевается, что существует некоторая вариация между иммуноглобулинами в отношении их участка Fc IgG<sub>1</sub>, участка Fc IgG<sub>2</sub>, участка Fc IgG<sub>3</sub>, участка Fc IgG<sub>4</sub>, участка Fc IgM, участка Fc IgA, участка Fc IgD и участка Fc IgE (см., например, Padlan, Molecular Immunology, 31(3), 169-217 (1993)). Термин мономер Fc относится к последним двум константным участкам тяжелой цепи IgA, IgD и IgG и к последним трем константным участкам тяжелой цепи IgE и IgM. Кроме того, мономер Fc может включать в себя гибкий шарнирный N-конец к указанным доменам. В случае IgA и IgM мономер Fc может включать в себя J-цепь. Для IgG часть Fc содержит иммуноглобулиновые домены CH2 и CH3 и шарнир между первыми двумя доменами и CH2. Хотя границы части Fc иммуноглобулина могут варьировать, пример для участка Fc тяжелой цепи IgG человека, включающего функциональный шарнир, домены CH2 и CH3, может быть определен, например, как содержащий остатки с D231 (шарнирный участок) по P476 (С-конца домена CH3) или с D231 по L476, соответственно, для IgG<sub>4</sub>, где нумерация соответствует Kabat.

Конструкция антитела по изобретению может, следовательно, содержать в порядке от N- к С-концу:

- (a) первый связывающий домен;
- (b) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8 и 9;
- (c) второй связывающий домен;
- (d) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 8 и 9;
- (e) первый полипептидный мономер третьего домена (содержащий шарнир, CH2 и домен CH3);
- (f) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 301, 302, 303 и 304; и
- (g) второй полипептидный мономер третьего домена (содержащий шарнир, CH2 и домен CH3).

Кроме того, конструкция антитела по изобретению предпочтительно содержит в порядке от N-конца к С-концу

первый связывающий домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 219 и SEQ ID NO: 229;

пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8 и 9;

второй связывающий домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 103 (см. также SEQ ID NO: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 или 187 WO 2008/119567);

пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 8 и 9; и

третий домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 260-267.

Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления изобретения конструкция антитела по данному изобретению содержит или состоит из полипептида, выбранного из группы, состоящей из представленных в SEQ ID NO: 268-299.

Кроме того, в одном варианте осуществления изобретения конструкция антитела по данному изобретению предпочтительно содержит или состоит из полипептида, выбранного из группы, состоящей из представленных в SEQ ID NO: 276-287.

Дополнительно в предпочтительном варианте осуществления изобретения конструкция антитела по данному изобретению содержит или состоит из полипептида, выбранного из группы, состоящей из представленных в SEQ ID NO: 276, 280 и 284, более предпочтительно содержит или состоит из полипептида, представленного в SEQ ID NO: 280.

Ковалентные модификации конструкций антител также включены в данное изобретение и обычно, но не всегда, осуществляются посттрансляционно. Например, несколько типов ковалентных модификаций конструкции антитела вводятся в молекулу путем взаимодействия конкретных аминокислотных остатков конструкции антитела с органическим дериватизирующим агентом, который способен вступать в реакцию с выбранными боковыми цепями или N-или С-концевыми остатками.

Остатки цистеина чаще всего вводят в реакцию с  $\alpha$ -галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, с получением карбоксиметильных или карбок-

сиамидометильных производных. Кроме того, остатки цистеина дериватизируют введением в реакцию с бромтрифторацетоном,  $\alpha$ -бром- $\beta$ -(5-имидазол) пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеинимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлорртутьбензоатом, 2-хлорртуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Гистидиновые остатки дериватизируют введением в реакцию с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, поскольку этот агент относительно специфичен в отношении гистидиновой боковой цепи. Подходящим является также пара-бромфенацилбромид; реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М какодилате натрия при pH 6,0. Лизиновые и аминоконцевые остатки вводят в реакцию с ангидридами янтарной или других карбоновых кислот. Дериватизация при помощи этих агентов приводит к изменению заряда остатков лизина на противоположный. Другие подходящие реагенты для дериватизации альфа-аминосодержащих остатков включают в себя имидоэфиры, такие как метилпиколинимидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборгидрид; тринитробензолсульфовую кислоту; O-метилизомочевину; 2,4-пентандион; и катализируемую трансаминазой реакцию с глиоксилатом.

Остатки аргинина модифицируют введением в реакцию с одним или несколькими обычными реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Дериватизация остатков аргинина требует, чтобы реакция проводилась в щелочных условиях из-за высокого значения рКа гуанидиновой функциональной группы. Кроме того, эти реагенты могут вступать в реакцию с группами лизина, а также с ипсилон-аминогруппой аргинина.

Конкретную модификацию тирозильных остатков можно осуществить с конкретной целью введения спектральных меток в тирозильные остатки путем введения в реакцию с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометаном. Чаще всего N-ацетилимидазол и тетранитрометан применяют для образования O-ацетилтирозильных соединений и 3-нитропроизводных соответственно. Тирозильные остатки йодируют с применением  $^{125}\text{I}$  или  $^{131}\text{I}$ , получая меченые белки для применения в радиоиммунологическом анализе, причем подходящим является описанный выше способ с применением хлорамина Т.

Карбоксильные боковые группы (аспартил или глутамил) избирательно модифицируют введением в реакцию с карбодиимидами ( $\text{R}'\text{-N}=\text{C}=\text{N}\text{-R}'$ ), где R и R' представляют собой необязательно разные алкильные группы, такими как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азоний-4,4-диметилпентил)карбодиимид. Кроме того, аспартильные и глутамильные остатки превращают в аспарагинильные и глутаминильные остатки введением в реакцию с ионами аммония.

Дериватизация при помощи бифункциональных агентов пригодна для поперечного сшивания конструкций антител по данному изобретению с нерастворимой в воде матрицей подложки или поверхностью для применения различными способами. Обычно применяемые поперечно-сшивающие агенты включают в себя, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаровый альдегид, эфиры N-гидроксисукцинимиды, например, сложные эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные имидоэфиры, включая дисукцинимидиловые сложные эфиры, такие как 3,3'-дителиобис(сукцинимидилпропионат) и бифункциональные малеинимиды, такие как бис-N-малеинимидо-1,8-октан. Дериватирующие агенты, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дителио]пропиоимидат, дают промежуточные фотоактивируемые соединения, которые способны образовывать поперечные связи под действием света. В качестве альтернативы, реакционноспособные нерастворимые в воде матрицы, такие как активированные цианогена бромидом углеводы и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США №№ 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440 применяются для иммобилизации белка.

Глутаминильные и аспарагинильные остатки часто дезамидируют до соответствующих глутамильных и аспартильных остатков. В качестве альтернативы, эти остатки дезамидируют в слабокислых условиях. Любая форма этих остатков включена в данное изобретение.

Другие модификации включают в себя гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп остатков серина или треонина, метилирование  $\alpha$ -аминогрупп в боковых цепях лизина, аргинина и гистидина (Т. Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой вид ковалентной модификации конструкций антител, включенных в данное изобретение, включает в себя модификацию характера гликозилирования белка. Как известно в данной области техники, характер гликозилирования может зависеть как от последовательности белка (например, наличия или отсутствия гликозилирования отдельных аминокислотных остатков, обсуждаемых ниже), так и от клетки-хозяина или организма, в котором образуется белок. Конкретные системы экспрессии рассмотрены ниже.

Гликозилирование полипептидов обычно является N-связанным или O-связанным. N-связанный относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, являются распознаваемыми последовательностями для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирова-

ния. О-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбонильной группе, чаще всего серину или треонину, хотя также могут применяться 5-гидроксипролин или 5-гидроксиллизин.

Добавление сайтов гликозилирования к конструкции антитела обычно осуществляют путем модификации аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или большее количество описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Кроме того, модификация может быть осуществлена путем добавления или замещения одного или большего количества остатков серина или треонина в исходной последовательности (для сайтов, связанных с О-гликозилированием). Для удобства аминокислотную последовательность конструкции антитела предпочтительно модифицируют при помощи изменений на уровне ДНК, в частности, путем мутации ДНК, кодирующей полипептид, в заранее выбранных основаниях, таким образом, что образуются кодоны, которые будут транслироваться в необходимые аминокислоты.

Другой способ увеличения количества углеводных фрагментов на конструкции антитела представляет собой химическое или ферментативное связывание гликозидов с белком. Преимущество таких методов состоит в том, что они не требуют продуцирования белка в клетке-хозяине, которая обладает способностью к гликозилированию для N- и О-связанного гликозилирования. В зависимости от применяемого способа связи сахар(а) может(гут) быть присоединен(ы) к (а) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как в цистеине, (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, таким как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO 87/05330, и в Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

Удаление углеводных фрагментов, присутствующих в исходной конструкции антитела, может быть осуществлено химически или ферментативно. Химическое дегликозилирование требует воздействия на белок соединения трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Такая обработка приводит к расщеплению большинства или всех сахаров, за исключением линкерного сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), оставляя полипептид интактным. Химическое дегликозилирование описано Nakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 и Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118: 131. Ферментативное расщепление углеводных фрагментов на полипептидах может быть достигнуто путем применения множества эндо- и экзогликозидаз, как описано Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138: 350. Гликозилирование на потенциальных сайтах гликозилирования может быть предотвращено при помощи соединения туникамицина, как описано Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 3105. Туникамицин блокирует образование белок-N-гликозидных связей.

Другие модификации конструкции антитела также включены в данное изобретение. Например, другой вид ковалентной модификации конструкции антитела включает в себя связывание конструкции антитела с различными небелковыми полимерами, включая, но не ограничиваясь этим, различные полиолы, такие как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, полиоксикарбонаты или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, способом, описанным в патентах США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Кроме того, как известно в данной области техники, замены аминокислот могут быть произведены в различных положениях внутри конструкции антитела, например, для упрощения добавления полимеров, таких как ПЭГ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ковалентная модификация конструкций антител по изобретению включает в себя добавление одной или большего количества меток. Группа метки может быть соединена с конструкцией антитела посредством спейсерных плеч различной длины, чтобы уменьшить потенциальное стерическое затруднение. Различные способы введения меток в белки известны в данной области техники и могут применяться при реализации данного изобретения. Термин "метка" или "маркерная группа" относится к любой обнаруживаемой метке. В общем, метки делятся на различные классы, в зависимости от анализа, в котором они должны быть обнаружены, -следующие примеры включают в себя, но не ограничиваясь этим:

a) изотопные метки, которые могут быть радиоактивными или тяжелыми изотопами, такими как радиоизотопы или радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ );

b) магнитные метки (например, магнитные частицы);

c) группы с окислительно-восстановительной активностью;

d) оптические красители (включая, но не ограничиваясь этим, хромофоры, люминофоры и флуорофоры), такие как флуоресцентные группы (например, флуоресцеин изотиоцианат, ФИТЦ (FITC), родамин, лантаноидные люминофоры), хемилюминесцентные группы и флуорофоры, которые могут представлять собой "низкомолекулярные" -форы или белковые -форы;

e) ферментативные группы (например, пероксидаза хрена,  $\beta$ -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза)

f) биотинилированные группы

g) предопределенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар лейцинового zipper, сайты связывания для вторичных антител, связывающиеся с металлами домены, метки эпитопа и т.д.).

Под "флуоресцентной меткой" понимается любая молекула, которая может быть обнаружена вследствие присущих ей флуоресцентных свойств. Подходящие флуоресцентные метки включают в себя, но не ограничиваясь этим, флуоресцеин, родамин, тетраметилборамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, Люцифер желтый, Каскадный голубой, Техасский красный, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Красный 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Красный 705, Орегонский зеленый, красители Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Каскадный голубой, Каскадный желтый и R-фикоэритрин, ФЭ (PE) (Molecular Probes, Юджин, штат Орегон), ФИТЦ (FITC), родамин и Техасский красный (Pierce, Рокфорд, штат Иллинойс), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Питтсбург, Пенсильвания). Подходящие оптические красители, включая флуорофоры, описаны Richard P. Haugland в *Molecular Probes Handbook*.

Кроме того, подходящие белковые флуоресцентные метки включают в себя, но не ограничиваясь этим, зеленый флуоресцентный белок, в том числе ЗФБ (GFP) видов *Renilla*, *Ptilosarcus* или *Aequorea* (Chalfie et al., 1994, *Science* 263: 802-805), усиленный зеленый флуоресцентный белок, УЗФБ (EGFP) (Clontech Laboratories, Inc., учетный номер Genbank U55762), синий флуоресцентный белок, СФБ (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24: 462-471; Heim et al., 1996, *Curr. Biol.* 6: 178-182), усиленный желтый флуоресцентный белок, УЖФБ (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), люциферазу (Ichiki et al., 1993, *J. Immunol.* 150: 5408-5417)  $\beta$ -галактозидазу (Nolan et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2603-2607) и *Renilla* (WO92/15673, WO95/07463, WO 98/14605, WO 98/26277, WO 99/49019, патенты США №№ 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558).

Домены лейцинового zipper представляют собой пептиды, которые способствуют олигомеризации белков, в которых они обнаружены. Лейциновые zipper первоначально были идентифицированы в нескольких ДНК-связывающих белках (Landschulz et al., 1988, *Science* 240: 1759) и с тех пор обнаружены во множестве различных белков. Среди известных лейциновых zipper встречающиеся в природе пептиды и их производные, которые димеризуют или тримеризуют. Примеры доменов лейцинового zipper, подходящих для получения растворимых олигомерных белков, описаны в заявке РСТ WO 94/10308, а лейциновый zipper, полученный из белка D сурфактанта легких, БСД (SPD), описан в Hoore et al., 1994, *FEBS Letters* 344: 191. Применение модифицированного лейцинового zipper, который обеспечивает стабильную тримеризацию слитого с ним гетерологичного белка, описано в Fanslow et al., 1994, *Semin. Immunol.* 6: 267-78. В одном из подходов рекомбинантные слитые белки, содержащие фрагмент или производное антитела против МЗЛН (MSLN), слитые с пептидом лейцинового zipper, экспрессируются в подходящих клетках-хозяевах, а растворимые олигомерные фрагменты антитела против МЗЛН (MSLN) или производные, которые образуются, выделяют из супернатанта культуры.

Кроме того, конструкция антитела по изобретению может содержать дополнительные домены, которые, например, являются полезными для выделения молекулы или имеют отношение к адаптированному фармакокинетическому профилю молекулы. Домены, полезные для выделения конструкции антитела, могут быть выбраны из пептидных мотивов или вторично введенных фрагментов, которые могут быть захвачены в способе выделения, например, колонкой для выделения. Неограничивающие варианты таких дополнительных доменов включают в себя пептидные мотивы, известные как маркер Мус, маркер НАТ, маркер НА, маркер ТАР, маркер GST, связывающий домен хитина, СДХ (маркер CBD), мальтозосвязывающий белок, МСБ (маркер MBP), маркер Flag, маркер Strep и их варианты (например, маркер StrepII) и маркер His. Все описанные в данном изобретении конструкции антител, характеризующиеся идентифицированными CDR, предпочтительно содержат домен маркера His, который обычно известен как повтор последовательных остатков His в аминокислотной последовательности молекулы, предпочтительно пяти, и более предпочтительно шести остатков His (гексагистидин). Маркер His может быть расположен, например, на N- или C-конце конструкции антитела, предпочтительно он расположен на C-конце. Наиболее предпочтительно гексагистидиновый маркер (НННННН) (SEQ ID NO: 10) соединен посредством пептидной связи с C-концом конструкции антитела в соответствии с изобретением.

Первый связывающий домен конструкции антитела по данному изобретению связывается с МЗЛН (MSLN) человека на поверхности клетки-мишени. Предпочтительная аминокислотная последовательность МЗЛН (MSLN) человека представлена в SEQ ID NO: 231, 232 и 233. Следовательно, первый связывающий домен в соответствии с изобретением предпочтительно связывается с МЗЛН (MSLN), когда последний экспрессируется естественным образом экспрессирующими клетками или клеточными линиями и/или клетками или клеточными линиями, трансформированными или (стабильно/временно) трансфектированными МЗЛН (MSLN). В предпочтительном варианте осуществления изобретения первый связывающий домен дополнительно связывается с МЗЛН (MSLN), когда МЗЛН (MSLN) применяется в качестве молекулы "мишени" или "лиганда" в анализе связывания *in vitro*, таком как BIAcore или Scatchard. "Клетка-мишень" может быть любой прокариотической или эукариотической клеткой, экспрессирующей МЗЛН (MSLN) на своей поверхности; предпочтительно клетка-мишень представляет собой клетку, которая является частью организма человека или животного, такую как клетка рака яичника, клетка рака поджелудочной железы, клетка мезотелиомы, клетка рака легкого, клетка рака желудка и клетка тройно-

го отрицательного рака молочной железы.

Аффинность первого связывающего домена против МЗЛН (MSLN) человека предпочтительно составляет меньше или равно 20 нМ, более предпочтительно меньше или равно 10 нМ, еще более предпочтительно меньше или равно 5 нМ, еще более предпочтительно меньше или равно 2 нМ, еще более предпочтительно меньше или равно 1 нМ, еще более предпочтительно меньше или равно 0,6 нМ, еще более предпочтительно меньше или равно 0,5 нМ и наиболее предпочтительно меньше или равно 0,4 нМ. Аффинность может быть измерена, например, в анализе VIAcore или в анализе Scatchard, например, как описано в примерах. Кроме того, специалисту в данной области техники хорошо известны другие способы определения аффинности; см., например, прилагаемый пример 3.

Кроме того, включены модификации аминокислотных последовательностей конструкций антител, описанных в данном документе. Например, может быть желательным улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства конструкции антитела. Варианты аминокислотных последовательностей конструкций антител получают путем введения соответствующих модификаций нуклеотидов в нуклеиновую кислоту конструкции антитела или путем синтеза пептидов. Все описанные ниже модификации аминокислотной последовательности должны приводить к созданию конструкции антитела, которое сохраняет желаемую биологическую активность (связывание с МЗЛН (MSLN) и КД3 (CD3)) немодифицированной родительской молекулы.

Термин "аминокислота" или "аминокислотный остаток" обычно относится к аминокислоте, соответствующей признанному в данной области техники определению, такому как аминокислота, выбранная из группы, состоящей из: аланина (Ala или A); аргинина (Arg или R); аспарагина (Asn или N); аспарагиновой кислоты (Asp или D); цистеина (Cys или C); глутамина (Gln или G); глутаминовой кислоты (Glu или E); глицина (Gly или G); гистидина (His или H); изолейцина (Ile или I); лейцина (Leu или L); лизина (Lys или K); метионина (Met или M); фенилаланина (Phe или F); пролина (Pro или P); серина (Ser или S); треонина (Thr или T); триптофана (Trp или W); тирозина (Tyr или Y); и валина (Val или V), хотя по желанию могут применяться модифицированные, синтетические или редкие аминокислоты. Как правило, аминокислоты могут быть сгруппированы как содержащие неполярную боковую цепь (например, Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); отрицательно заряженную боковую цепь (например, Asp, Glu); положительно заряженную боковую цепь (например, Arg, His, Lys); или незаряженную полярную боковую цепь (например, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp и Tyr).

Модификации аминокислот включают в себя, например, делеции и/или инсерции и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях конструкций антител. Любая комбинация делеции, инсерции и замены производится для получения окончательной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками. Кроме того, модификации аминокислот могут изменять посттрансляционные процессы для конструкций антител, такие как модификация количества или положения сайтов гликозилирования.

Например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот могут быть вставлены или удалены в каждом из CDR (конечно, в зависимости от их длины), в то время как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 25 аминокислот могут быть вставлены или удалены в каждом из FR. Предпочтительно инсерции аминокислотной последовательности включают в себя амино- и/или карбоксиконцевое слияние с длиной в диапазоне от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков до полипептидов, содержащих сто или большее количество остатков, а также инсерции одного или большего количества аминокислотных остатков внутри последовательности. Инсерционный вариант конструкции антитела по изобретению включает в себя слияние фермента с N-концом или C-концом конструкции антитела или слияние с полипептидом, который увеличивает период полувыведения конструкции антитела из сыворотки.

Сайты, представляющие наибольший интерес для заместительного мутагенеза, включают в себя CDR тяжелой и/или легкой цепи, в частности гипервариабельные участки, но также включены модификации FR тяжелой и/или легкой цепей. Замены предпочтительно представляют собой консервативные замены, как описано в данном изобретении. Предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот могут быть заменены в CDR, тогда как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 25 аминокислот могут быть заменены в каркасных участках, KY (FR) в зависимости от длины CDR или FR. Например, если последовательность CDR содержит 6 аминокислот, то предполагается, что одна, две или три из этих аминокислот заменены. Аналогично, если последовательность CDR содержит 15 аминокислот, предполагается, что одна, две, три, четыре, пять или шесть из этих аминокислот заменены.

Подходящий способ идентификации определенных остатков или участков конструкций антител, которые являются предпочтительными сайтами для мутагенеза, называется "аланин-сканирующим мутагенезом", как описано Cunningham и Wells в Science, 244: 1081-1085 (1989). Остаток или группу целевых остатков в конструкции антитела идентифицируют (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (наиболее предпочтительно аланином или полиаланином), чтобы повлиять на взаимодействие аминокислот с эпитопом.

Положения аминокислот, демонстрирующие функциональную чувствительность к заменам, затем уточняют путем введения дальнейших или других вариантов на или в сайтах замены. Таким образом, хотя сайт или участок для введения вариации аминокислотной последовательности определен заранее,

природа мутации сама по себе не должна быть predetermined. Например, для анализа или оптимизации эффективности мутации в заданном сайте аланиновое сканирование или случайный мутагенез можно осуществлять в целевом кодоне или участке, а варианты конструкции экспрессируемых антител подвергают скринингу на предмет оптимальной комбинации желаемой активности. Способы осуществления мутаций с заменой в предварительно определенных участках ДНК с известной последовательностью хорошо известны, например мутагенез с праймером M13 и мутагенез ПЦР. Скрининг мутантов проводят с применением анализов антигенсвязывающей активности, таких как связывание с МЗЛН (MSLN) или КДЗ (CD3).

Как правило, если аминокислоты заменены в одном или большем количестве или всех CDR тяжелой и/или легкой цепи, предпочтительно, чтобы полученная таким образом последовательность, "содержащая замены", была по меньшей мере на 60 или 65%, более предпочтительно на 70 или 75%, еще более предпочтительно на 80 или 85% и особенно предпочтительно на 90 или 95% идентична "оригинальной" последовательности CDR. Это означает, что от длины CDR зависит, до какой степени он идентичен последовательности "содержащей замены". Например, CDR, содержащий 5 аминокислот, предпочтительно на 80% идентичен его последовательности, содержащей замены, что соответствует замене по меньшей мере одной аминокислоты. Соответственно CDR конструкции антитела могут иметь разную степень идентичности с их последовательностями, содержащими замены, например, для CDRL1 этот показатель может составлять 80%, тогда как для CDRL3 90%.

Предпочтительные замены являются консервативными заменами. Однако любая замена (включая неконсервативную замену или одну или большее количество "типичных замен", перечисленных в табл. 1 ниже) предусматривается при условии, что конструкция антитела сохраняет свою способность связываться с МЗЛН (MSLN) посредством первого связывающего домена и с КДЗ (CD3) или КДЗ (CD3) ипсилон посредством второго связывающего домена, и/или его CDR идентичны последовательности, содержащей замены (по меньшей мере на 60 или 65%, более предпочтительно на 70 или 75%, еще более предпочтительно на 80 или 85% и особенно предпочтительно на 90 или 95% идентичны "оригинальной" CDR-последовательности).

Консервативные замены приведены в табл. 1 под заголовком "предпочтительные замены". Если такие замены приводят к модификации биологической активности, то могут быть введены более существенные модификации, обозначенные в табл. 1 как "типичные замены", или, как дополнительно описано ниже, применительно к классам аминокислот, продукты подвергают скринингу на предмет желаемой характеристики.

Таблица 1. Замены аминокислот

Исходная	Типичные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	val, leu, ile	Val
Arg (R)	lys, gln, asn	Lys
Asn (N)	gln, his, asp, lys, arg	Gln
Asp (D)	glu, asn	Glu
Cys (C)	ser, ala	Ser
Gln (Q)	asn, glu	Asn
Glu (E)	asp, gln	Asp
Gly (G)	ala	Ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	Arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe	Leu
Leu (L)	норлейцин, ile, val, met, ala	Ile
Lys (K)	arg, gln, asn	Arg
Met (M)	leu, phe, ile	Leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	tyr, phe	Tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala	leu

Значительные модификации биологических свойств конструкции антитела по данному изобретению осуществляют путем выбора замен, которые существенно различаются по их влиянию на сохранение (а) структуры полипептидного скелета на участке замены, например, в виде листа или спиральной конформации или (b) заряда или гидрофобности молекулы на целевом участке или (c) объема боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки делятся на группы, на основании общих свойств боковой цепи: (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile; (2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr; (3) кислые:

asp, glu; (4) основные: asn, gin, his, lys, arg; (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: gly, pro; и (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замены означают обмен члена одного из этих классов на другой класс. Любой цистеиновый остаток, не участвующий в поддержании надлежащей конформации конструкции антитела, может быть заменен, как правило, серином, для улучшения устойчивости молекулы к окислению и предотвращения aberrантного поперечного сшивания. Напротив, цистеиновая(ые) связь(и) может(гут) быть введена(ы) в антитело для улучшения его стабильности (в частности, если антитело является фрагментом антитела, таким как фрагмент Fv).

Для аминокислотных последовательностей идентичность и/или сходство последовательностей определяют с применением стандартных методов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, алгоритм идентификации локальной последовательности Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482, алгоритм выравнивания для определения идентичности последовательностей Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443, метод поиска сходства Pearson and Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444, компьютеризованные реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программ Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), программу последовательностей Best Fit, описанная Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12: 387-395, предпочтительно с настройками по умолчанию, или путем проверки. Предпочтительно, процент идентичности вычисляют при помощи FastDB на основе следующих параметров: штраф за рассогласование 1; штраф за внесение гэпа 1; штраф за размер гэпа 0,33; и штраф за воссоединение 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Примером подходящего алгоритма является PILEUP. PILEUP осуществляет множественное выравнивание последовательностей из группы связанных последовательностей с применением прогрессивного попарного выравнивания. Он также может отображать дерево, иллюстрирующее отношения кластеризации, применяемые для осуществления выравнивания. В PILEUP применяется упрощение метода прогрессивного выравнивания Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35: 351-360; данный метод аналогичен методу, описанному Higgins and Sharp, 1989, CABIOS 5: 151-153. Подходящие параметры PILEUP, включая штраф за внесение гэпа по умолчанию 3,00, штраф за продление гэпа по умолчанию 0,10, и взвешенные концевые гэпы.

Другим примером подходящего алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402; и Karin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873-5787. Особенно подходящей программой BLAST является программа WU-BLAST-2, полученная из Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266: 460-480. В WU-BLAST-2 применяются несколько параметров поиска, большинство из которых имеют значения по умолчанию. Регулируемые параметры задаются со следующими значениями: длина перекрытия равна 1, доля перекрытия равна 0,125, пороговая длина слова (T) равна  $\ln$ . Параметры HSP S и HSP S2 являются динамическими значениями и определяются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, в которой осуществляется поиск последовательности, представляющей интерес; однако значения могут быть скорректированы для повышения чувствительности.

Дополнительным подходящим алгоритмом является гэппированный BLAST, описанный Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402. В гэппированном BLAST применяются баллы замены BLOSUM-62; пороговый параметр T установлен на уровне 9; метод с двумя ударами для запуска удлинений без гэпа, начисляет гэпы в размере  $k$  со штрафом 10 плюс  $k$ ;  $X_u$  установлен на уровне 16, а  $X_g$  установлен на уровне 40 для этапа поиска базы данных и на уровне 67 для выходной стадии алгоритмов. Выравнивание с гэпами запускается оценкой, соответствующей примерно 22 битам.

Как правило, гомология аминокислот, сходство или идентичность между отдельными вариантами CDR составляют по меньшей мере 60% для последовательностей, представленных в данном изобретении, и более типично с предпочтительно возрастающей гомологией или идентичностью по меньшей мере 65 или 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75 или 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и почти 100%. Аналогичным образом, "процент идентичности последовательности нуклеиновой кислоты" (%) в отношении последовательности нуклеиновой кислоты связывающихся белков, определенных в данном изобретении, определяется как процентное содержание нуклеотидных остатков в потенциальной последовательности, которые идентичны остаткам нуклеотидов в кодирующей последовательности конструкции антитела. В конкретном методе применяется модуль BLASTN WU-BLAST-2 с параметрами по умолчанию, с длиной перекрытия и долей перекрытия, установленными на уровне 1 и 0,125, соответственно.

Как правило, гомология, сходство или идентичность последовательностей нуклеиновой кислоты между нуклеотидными последовательностями, кодирующими отдельные варианты CDR, и нуклеотидными последовательностями, представленными в данном изобретении, составляет по меньшей мере 60% и более типично с предпочтительно возрастающей гомологией или идентичностью по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98% или 99% и почти 100%. Таким образом, "вариант CDR" представляет собой вариант с указанной гомологией, сходством или идентичностью с родительским CDR по изобретению и разделяет биологическую функцию, включая, но не ограничиваясь этим, по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% специфичности и/или активности родительского CDR.

В одном варианте осуществления изобретения процент идентичности конструкций антител в соответствии с изобретением человеческой зародышевой линии составляет больше или равно 70% или больше или равно 75%, более предпочтительно больше или равно 80% или больше или равно 85%, еще более предпочтительно больше или равно 90% и наиболее предпочтительно больше или равно 91%, больше или равно 92%, больше или равно 93%, больше или равно 94%, больше или равно 95% или даже больше или равно 96%. Считается, что идентичность генным продуктам зародышевой линии человека в форме антител является важным признаком с точки зрения снижения риска того, что терапевтические белки будут вызывать иммунный ответ против лекарственных средств у пациента во время лечения. Hwang & Foote ("Immunogenicity of engineered antibodies"; Methods 36 (2005) 3-10) продемонстрировали, что уменьшение количества не относящихся к человеку частей в конструкциях антител приводит к снижению риска индуцирования антител к лекарственным средствам у пациентов во время лечения. Путем сравнения исчерпывающего количества клинически оцениваемых лекарственных средств в форме антител и соответствующих данных иммуногенности, показана тенденция к снижению иммуногенности белка при гуманизации V-участков антител (в среднем 5,1% пациентов) по сравнению с антителами, несущими немодифицированные не относящиеся к человеку V-участки (в среднем 23,59% пациентов). Следовательно, более высокая степень идентичности последовательностям человека является желательной для белковых терапевтических средств V-участков в форме конструкций антител. Для указанной цели определения идентичности зародышевой линии V-участки VL могут быть выровнены с аминокислотными последовательностями сегментов V и сегментов J зародышевой линии человека (<http://vbase.mrc-sre.cam.ac.uk/>) при помощи программного обеспечения Vector NTI, и аминокислотная последовательность вычислена в процентах путем деления количества идентичных аминокислотных остатков на общее количество аминокислотных остатков VL. То же самое можно сделать для сегментов VH (<http://vbase.mrc-sre.cam.ac.uk/>), за исключением того, что VH CDR3 может быть исключен из-за его большого разнообразия и отсутствия партнеров по выравниванию из числа VH CDR3 зародышевой линии человека. Далее можно применить рекомбинантные методы для повышения степени идентичности последовательностей генам антител зародышевой линии человека.

В дополнительном варианте осуществления изобретения конструкции биспецифических антител по данному изобретению демонстрируют высокие выходы мономера в стандартных условиях исследования, например, в стандартном двухстадийном способе очистки. Предпочтительно выход мономера конструкций антител согласно изобретению составляет больше или равно 0,25 мг/л супернатанта, более предпочтительно больше или равно 0,5 мг/л, еще более предпочтительно больше или равно 1 мг/л и наиболее предпочтительно больше или равно 3 мг/л супернатанта.

Аналогично может быть определен выход димерных изоформ конструкции антитела и, следовательно, процент мономера (т.е., мономер: (мономер плюс димер)). Продуктивность мономерных и димерных конструкций антител и вычисленный процент мономера могут быть, например, получены на стадии очистки эксклюзионной хроматографией, ЭХ (SEC) в супернатанте культуры, полученном в результате стандартизированного производства в лабораторном масштабе в роллерных флаконах. В одном варианте осуществления изобретения процент мономера конструкций антител составляет больше или равно 80%, более предпочтительно больше или равно 85%, еще более предпочтительно больше или равно 90% и наиболее предпочтительно больше или равно 95%.

В одном варианте осуществления изобретения предпочтительная стабильность конструкций антител в плазме (соотношение EC<sub>50</sub> с плазмой и EC<sub>50</sub> без плазмы) составляет меньше или равно 5 или меньше или равно 4, более предпочтительно меньше или равно 3,5 или меньше или равно 3, еще более предпочтительно меньше или равно 2,5 или меньше или равно 2, и наиболее предпочтительно меньше или равно 1,5 или меньше или равно 1. Стабильность конструкции антитела в плазме можно протестировать путем инкубации конструкции в плазме человека при 37°C в течение 24 ч с последующим определением EC<sub>50</sub> в анализе цитотоксичности с высвобождением хрома-51. Эффекторные клетки в анализе цитотоксичности могут быть стимулированными обогащенными CD8-положительными Т-клетками человека. Клетки-мишени могут быть, например, клетками ЯКХ (CHO), трансфектированными МЗЛН (MSLN) человека. Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (Э:М) можно выбрать как 10:1. Пул плазмы человека, применяемый для этой цели, получают из крови здоровых доноров, собранной в шприцы, покрытые ЭДТА. Клеточные компоненты удаляют центрифугированием, верхнюю фракцию плазмы собирают и объединяют в пул. В качестве контроля конструкции антител разбавляют непосредственно перед анализом цитотоксичности средой RPMI-1640. Стабильность в плазме вычисляют как соотношение EC<sub>50</sub> (после инкубации в плазме) и EC<sub>50</sub> (контроль) (См. Пример 6).

Кроме того, степень превращения конструкции антител по изобретению из мономера в димер предпочтительно является низкой. Превращение может быть измерено в разных условиях и проанализирова-



но при помощи высокоэффективной эксклюзионной хроматографии. См. Пример 9. Например, инкубацию мономерных изоформ конструкций антител можно проводить в течение 7 дней при температуре 37°C и концентрациях, например, 100 мкг/мл или 250 мкг/мл в инкубаторе. В этих условиях конструкции антител по изобретению предпочтительно демонстрируют процентное содержание димера, составляющее меньше или равно 5%, более предпочтительно меньше или равно 4%, еще более предпочтительно меньше или равно 3%, еще более предпочтительно меньше или равно 2,5%, еще более предпочтительно меньше или равно 2%, еще более предпочтительно меньше или равно 1,5% и наиболее предпочтительно меньше или равно 1% или меньше или равно 0,5% или даже 0%.

Кроме того, конструкциям биспецифических антител по данному изобретению предпочтительно свойственна очень низкая степень превращения в димер после ряда циклов замораживания/оттаивания. Например, содержание мономера конструкции антитела доводят до концентрации 250 мкг/мл, например, в буфере препарата для приготовления и подвергают трем циклам замораживания/оттаивания (замораживание при минус 80°C в течение 30 мин с последующим оттаиванием в течение 30 мин при комнатной температуре), а затем анализируют высокоэффективной ЭХ (SEC) для определения процента изначально мономерной конструкции антитела, которая была превращена в димерную конструкцию антитела.

Предпочтительно процентное содержание димерных конструкций биспецифических антител составляет меньше или равно 5%, более предпочтительно меньше или равно 4%, еще более предпочтительно меньше или равно 3%, еще более предпочтительно меньше или равно 2,5%, еще более предпочтительно меньше или равно 2%, еще более предпочтительно меньше или равно 1,5%, и наиболее предпочтительно меньше или равно 1% или даже меньше или равно 0,5%, например, после трех циклов замораживания/оттаивания.

Конструкции биспецифических антител по данному изобретению предпочтительно демонстрируют благоприятную термостабильность с температурой агрегации больше или равно 45°C или больше или равно 50°C, более предпочтительно больше или равно 51°C, больше или равно 52°C, больше или равно 53°C или больше или равно 54°C, еще более предпочтительно больше или равно 56°C или больше или равно 57°C и наиболее предпочтительно больше или равно 58°C или больше или равно 59°C. Показатель термостабильности может быть определен в терминах температуры агрегации антител следующим образом: раствор антитела с концентрацией 250 мкг/мл переносят в одноразовую кювету и помещают в устройство динамического рассеяния света, ДРС (DLS). Образец нагревают от 40 до 70°C со скоростью нагрева 0,5°C/мин с постоянным определением измеряемого радиуса. Для вычисления температуры агрегации антитела применяют увеличение радиуса, указывающего на плавление белка и агрегацию (См. Пример 10).

В качестве альтернативы, кривые температуры плавления могут быть определены при помощи дифференциальной сканирующей калориметрии, ДСК (DSC), чтобы определить, присущую белку биофизическую стабильность для конструкций антител. Эти эксперименты выполняют с применением устройства VP-DSC MicroCal LLC (Нортгемптон, штат Массачусетс, США). Поглощение энергии образцом, содержащим конструкцию антитела, регистрируют при температуре от 20 до 90°C по сравнению с образцом, содержащим только буфер препарата. Конечную концентрацию конструкций антител доводят до 250 мкг/мл, например, в буфере анализа ЭХ (SEC). Для регистрации соответствующей кривой плавления общую температуру образца повышают ступенчато. При каждой температуре T регистрируется поглощение энергии образцом и буферным раствором препарата. Зависимость разницы в поглощении энергии  $C_p$  (кКал/моль/°C) образцом минус эталонная величина от соответствующей температуры наносят на график. Температуру плавления определяют как температуру первого максимума поглощения энергии.

Кроме того, предполагается, что мутность (измеренная по данным оптической плотности на длине волны 340 нм, (OD340) после концентрирования очищенной мономерной конструкции антитела до 2,5 мг/мл и инкубации на протяжении ночи) конструкции биспецифического антитела против МЗЛН (MSLN) x КДЗ (CD3) по изобретению будет составлять меньше или равно 0,2, предпочтительно меньше или равно 0,15, более предпочтительно меньше или равно 0,12, еще более предпочтительно меньше или равно 0,1 или даже меньше или равно 0,09 и наиболее предпочтительно меньше или равно 0,08 или меньше или равно 0,07 (см. Пример 11).

В дополнительном варианте осуществления изобретения конструкция антитела в соответствии с изобретением является стабильной при кислых значениях pH. Чем более толерантно конструкция антитела ведет себя при нефизиологических значениях pH, таких как pH 5,5 (значение pH, которое требуется для запуска, например, катионообменной хроматографии), тем выше степень выделения конструкции антитела, элюируемой из ионообменной колонки, относительно общего количества загруженного белка. Выход конструкции антитела из ионообменной (например, катионообменной) колонки при pH 5,5 предпочтительно составляет больше или равно 30%, более предпочтительно больше или равно 40%, более предпочтительно больше или равно 50%, еще более предпочтительно больше или равно 60%, еще более предпочтительно больше или равно 70% еще более предпочтительно больше или равно 80%, еще более предпочтительно больше или равно 90%, еще более предпочтительно больше или равно 95% и наиболее предпочтительно больше или равно 99% (см. Пример 7).

Кроме того, предполагается, что конструкции биспецифического антитела по данному изобретению

проявляют терапевтическую эффективность или противоопухолевую активность. Это можно оценить, например, в ходе исследования, описанного в дополнительном примере модели ксенотрансплантации опухоли человека в поздней стадии:

В 1 день исследования  $5 \times 10^6$  клеток МЗЛН (MSLN)-положительной клеточной линии рака человека (например, OVCAR-8) подкожно вводят в дорсальную часть правого бока спины самок мышей NOD/SCID. Когда средний объем опухоли достигает около  $100 \text{ мм}^3$ , разведенные *in vitro* КД3 (CD3)-положительные Т-клетки человека трансплантируют мышам путем инъекции примерно  $2 \times 10^7$  клеток в брюшную полость животных. Мыши контрольной группы основы 1 не получают эффекторных клеток и используются как контроль без трансплантации для сравнения с контрольной группой основы 2 (получающей эффекторные клетки) для контроля влияния только Т-клеток на рост опухоли. Лечение антител начинают, когда средний объем опухоли достигает около  $200 \text{ мм}^3$ . Средний размер опухоли в каждой группе лечения в день начала лечения не должен быть статистически отличным от любой другой группы (дисперсионный анализ). Мышей лечат  $0,5 \text{ мг/кг/день}$  конструкции биспецифического антитела против МЗЛН (MSLN) x КД3 (CD3) путем внутривенной инъекции болюса в течение примерно 15-20 дней. Опухоли измеряют штангенциркулем во время исследования и прогресс оценивают путем межгруппового сравнения объемов опухоли, ОО (TV). Подавление роста опухоли Т/С [%] определяют путем вычисления TV в виде  $\text{T/C \%} = 100 \times (\text{медиана TV анализируемой группы}) / (\text{медиана TV контрольной группы } 2)$ .

Специалисту в данной области техники известно, каким образом модифицировать или адаптировать некоторые параметры этого исследования, такие как количество инъекционно введенных опухолевых клеток, место инъекции, количество трансплантированных Т-клеток человека, количество биспецифических конструкций антител для введения, и сроки, при этом достигая значимого и воспроизводимого результата. Предпочтительно подавление роста опухоли Т/С [%] составляет меньше или равно 70 или меньше или равно 60, более предпочтительно меньше или равно 50 или меньше или равно 40, еще более предпочтительно меньше или равно 30 или меньше или равно 20 и наиболее предпочтительно меньше или равно 10 или меньше или равно 5 или даже меньше или равно 2,5.

Дополнительно изобретение относится к молекуле полинуклеотида/нуклеиновой кислоты, кодирующей конструкцию антитела по изобретению.

Полинуклеотид представляет собой биополимер, состоящий из 13 или большего количества нуклеотидных мономеров, ковалентно связанных в нить. ДНК (такая как кДНК) и РНК (такая как мРНК) представляют собой примеры полинуклеотидов с разной биологической функцией. Нуклеотиды являются органическими молекулами, которые служат мономерами или субъединицами молекул нуклеиновых кислот, таких как ДНК или РНК. Молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотида может быть двунитовой и однонитовой, линейной и круговой. Она предпочтительно состоит из вектора, который предпочтительно содержится в клетке-хозяине. Указанная клетка-хозяин представляет собой, например, клетку после трансформации или трансфекции вектором или полинуклеотидом по изобретению, способным экспрессировать конструкцию антитела. Для этой цели молекула полинуклеотида или нуклеиновой кислоты функционально связана с контрольными последовательностями.

Генетический код представляет собой набор правил, при помощи которых информация, закодированная в пределах генетического материала (нуклеиновых кислот) транслируется в белки. Биологическое декодирование в живых клетках осуществляется рибосомой, которая связывает аминокислоты в порядке, определенном мРНК, с применением молекул тРНК для переноса аминокислот и считывания трех нуклеотидов мРНК за один раз. Код определяет, каким образом последовательности этих нуклеотидных триплетов, называемых кодонами, определяют, какая аминокислота будет добавляться во время синтеза белка. За некоторыми исключениями, трехнуклеотидный кодон в последовательности нуклеиновой кислоты определяет одну аминокислоту. Поскольку подавляющее большинство генов кодируется в точности одинаковым кодом, этот конкретный код часто называют каноническим или стандартным генетическим кодом. Хотя генетический код определяет последовательность белка для данного кодирующего участка, другие геномные участки могут влиять на то, когда и где вырабатываются эти белки.

Кроме того, в изобретении предложен вектор, содержащий молекулу полинуклеотида/нуклеиновой кислоты по изобретению.

Вектор представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, применяемую в качестве носителя для переноса (чужеродного) генетического материала в клетку. Термин "вектор" включает, но не ограничиваясь этим, плазмиды, вирусы, космиды и искусственные хромосомы. В общем, сконструированные векторы содержат источник репликации, сайт множественного клонирования и селекционный маркер. Сам вектор, как правило, представляет собой нуклеотидную последовательность, обычно последовательность ДНК, которая содержит инсерцию (трансген) и последовательность большего размера, которая служит в качестве "скелета" вектора. Современные векторы могут обладать дополнительными признаками, помимо трансгенной инсерции и скелета: промотор, генетический маркер, устойчивость к антибиотикам, репортерный ген, нацеливающая последовательность, маркер очистки белка. Векторы, называемые векторами экспрессии (конструкции экспрессии), специально предназначены для экспрессии трансгена в клетке-мишени и, как правило, содержат контрольные последовательности.

Термин "контрольные последовательности" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Контрольные последовательности, которые подходят для прокариотов, например, включают в себя промотор, необязательно последовательность оператора и сайт связывания с рибосомой. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", если она размещена в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК прекурсора или секреторного лидера функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в виде белка-прекурсора, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания с рибосомой функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы упростить трансляцию. Как правило, "функционально связанный" означает, что связанные с ним последовательности ДНК являются непрерывными, а в случае секреторного лидера являются смежными и находятся в рамке считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть смежными. Связывание осуществляется путем лигирования в подходящих рестрикционных сайтах. Если такие сайты отсутствуют, то применяются синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры в соответствии с обычной практикой.

"Трансфекция" представляет собой процесс преднамеренного введения молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов (включая векторы) в клетки-мишени. Этот термин в основном используется для невирусных методов в эукариотических клетках. Трансдукция часто используется для описания опосредованного вирусом переноса молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов. Трансфекция животных клеток обычно включает в себя кратковременное открытие пор или "отверстий" в клеточной мембране, что позволяет захват материала. Трансфекцию можно осуществлять с применением фосфата кальция, путем электропорации, путем сдавливания клеток или путем смешивания катионного липида с материалом для получения липосом, которые сливаются с клеточной мембраной и переносят свой "груз" внутрь.

Термин "трансформация" используется для описания невирусного переноса молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов (включая векторы) в бактерии, а также в клетки, не являющиеся животными эукариотическими клетками, в том числе в растительные клетки. Таким образом, трансформация представляет собой генетическую модификацию бактериальной или неживотной эукариотической клетки, являющуюся результатом прямого поглощения из окружающей среды сквозь клеточную(ые) мембрану(ы) и последующей инкорпорации экзогенного генетического материала (молекул нуклеиновой кислоты). Трансформация может быть осуществлена при помощи искусственных средств. Чтобы произошла трансформация, клетки или бактерии должны находиться в состоянии компетентности, которое может возникать как ограниченный по времени ответ на условия окружающей среды, такие как голодание и плотность клеток.

Кроме того, в изобретении предложена клетка-хозяин, трансформированная или трансфектированная молекулой полинуклеотида/нуклеиновой кислоты или вектором по изобретению.

Как используется в данном документе, термины "клетка-хозяин" или "клетка-реципиент" предназначены для включения любой отдельной клетки или клеточной культуры, которые могут быть или стать реципиентами векторов, экзогенных молекул нуклеиновой кислоты и полинуклеотидов, кодирующих конструкцию антитела по данному изобретению; и/или реципиентами самой конструкции антитела. Введение соответствующего материала в клетку осуществляют посредством трансформации, трансфекции и т.п. Кроме того, термин "клетка-хозяин" включает потомства или потенциальное потомство одной клетки. Поскольку определенные модификации могут произойти в последующих поколениях из-за естественной, случайной или преднамеренной мутации или из-за воздействия окружающей среды, такое потомство фактически не может быть полностью идентичным (с точки зрения морфологии или геномного или полного комплемента ДНК) родительской клетке, но все еще включено в определение термина, используемого в данном документе. Подходящие клетки-хозяева включают в себя прокариотические или эукариотические клетки, а также включают в себя, но не ограничиваясь этим, бактерии, дрожжевые клетки, клетки грибов, растительные клетки и животные клетки, такие как клетки насекомых и клетки млекопитающих, например, мыши, крысы, макака или человека.

Конструкция антитела по изобретению может вырабатываться бактериями. После экспрессии конструкцию антитела по изобретению выделяют из клеточной пасты *E.coli* в растворимой фракции, и она может быть очищена посредством, например, аффинной и/или эксклюзионной хроматографии. Окончательная очистка может быть проведена аналогично способу очистки антитела, экспрессируемого, например, в клетках ЯКХ (СНО).

В дополнение к прокариотам эукариотические микробы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами клонирования или экспрессии конструкции антитела по изобретению. *Saccharomyces cerevisiae* или обычные пекарские дрожжи наиболее часто используются из числа микроорганизмов-хозяев низших эукариотов. Тем не менее, ряд других родов, видов и штаммов общедоступны и пригодны согласно данному изобретению, такие как *Schizosaccharomyces pombe*, хозяева *Kluveromyces*

ces, такие как *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilorum* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomycetes*, такие как *Schwanniomycetes occidentalis*; и нитчатые грибы, такие как *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, и хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии конструкции гликозилированного антитела по изобретению получают из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают в себя клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы и варианты и соответствующие разрешающие клетки-хозяева насекомых из организма хозяев, таких как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комары), *Aedes albopictus* (москиты), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Доступны различные вирусные штаммы для трансфекции, например, вариант L-1 вируса нуклеополиэдроза, ВНП (NPV) *Autographa californica* и штамм Bm-5 ВНП (NPV) *Bombyx mori*, притом, что такие вирусы могут применяться в качестве вируса в соответствии с данным изобретением, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Дополнительно в качестве хозяев могут использоваться культуры растительных клеток хлопка, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томатов, арабидопсиса и табака. Специалистам в данной области техники известны векторы клонирования и экспрессии, подходящие для выработки белков в культуре растительных клеток. См., например, Hiatt et al., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsaenko et al. (1995) *The Plant J* 8: 745-750, и Fecker et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986.

Однако наибольший интерес проявляется к клеткам позвоночных, а разведение клеток позвоночных в культуре (тканевая культура) стало шаблонной процедурой. Примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7, Американская коллекция типовых культур, АКТК, ATCC CRL 1651); эмбриональная линия почки человека (293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36: 59 (1977)); клетки почки детеныша хомяка, ПДХ (ВНК, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомяка/-дигидрофолатредуктаза, ДГФР (DHFR) (ЯКХ (CHO), Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216 (1980)); клетки Сертоли мышцы (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, 1413 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL5 1); клетки TRI (Mather et al., *Annals N. Y Acad. Sci.* (1982) 383: 44-68); клетки MRC 5; клетки FS4 и линия гепатомы человека (Hep G2).

В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к способу получения конструкции антитела по изобретению, причем указанный способ включает в себя культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях, позволяющих экспрессию конструкции антитела по изобретению и выделение продуцированной конструкции антитела из культуры.

Как используется в данном документе, термин "культивирование" относится к содержанию, дифференцировке, росту, пролиферации и/или разведению клеток *in vitro* в среде в подходящих условиях. Термин "экспрессия" включает в себя любую стадию, принимающую участие в выработке конструкции антитела по изобретению, включая, но не ограничиваясь этим, транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционную модификацию и секрецию.

При применении рекомбинантных методов конструкция антитела может вырабатываться внутриклеточно, в периплазматическом пространстве, или непосредственно секретироваться в среду. Если конструкцию антитела получают внутри клетки, то на первой стадии удаляются дебрис частиц, клетки-хозяева или лизированные фрагменты, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) описывают методику выделения антител, которые секретированы в периплазматическое пространство *E.coli*. Вкратце, клеточную пасту размораживают в присутствии ацетата натрия (рН 3,5), ЭДТА и фенилметилсульфонилфторида, ФМСФ (PMSF) в течение примерно 30 минут. Клеточный дебрис можно удалить центрифугированием. Если антитело секретировано в среду, то супернатанты из таких систем экспрессии обычно вначале концентрируют с применением коммерчески доступного фильтра для концентрации белка, например, ультрафильтрационной установки Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как ФМСФ (PMSF), может быть включен на любой из вышеперечисленных стадий для ингибирования протеолиза, а антибиотики могут быть включены для предотвращения роста случайных загрязнителей.

Конструкция антитела по изобретению, полученная из клеток-хозяев, может быть выделена или очищена с применением, например, гидроксипатитовой хроматографии, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии. Кроме того, доступны другие способы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на кремния диоксиде, хроматография на гепарине SEPHAROSE™, хроматография на анионо- или катионообменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хромато-фокусировка, ДНС-ПААГ (SDS-PAGE) и осаждение сульфатом аммония, в зависимости от антитела, подлежащего выделению. Es-

ли конструкция антитела по изобретению содержит домен СНЗ, то для очистки подходит смола Wakerbond ABX (JT Waker, Филлипсберг, штат Нью-Джерси).

Предпочтительной технологией очистки является аффинная хроматография. Матрица, к которой присоединен аффинный лиганд, чаще всего является агарозной, но доступны другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с заданным размером пор или поли(стиролдивинил)бензол позволяют более высокие скорости потока и более короткое время обработки, чем те, которые могут быть достигнуты при помощи агарозы.

Кроме того, в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию антитела по изобретению или конструкцию антитела, полученную в соответствии со способом по изобретению. Предпочтительно, гомогенность конструкции антитела в фармацевтической композиции по изобретению составляет больше или равно 80%, более предпочтительно больше или равно 81%, больше или равно 82%, больше или равно 83%, больше или равно 84% или больше или равно 85%, далее предпочтительно больше или равно 86%, больше или равно 87%, больше или равно 88%, больше или равно 89% или больше или равно 90%, еще далее предпочтительно больше или равно 91%, больше или равно 92%, больше или равно 93%, больше или равно 94% или больше или равно 95% и наиболее предпочтительно больше или равно 96%, больше или равно 97%, больше или равно 98% или больше или равно 99%.

Как используется в данном изобретении, термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, которая подходит для введения пациенту, предпочтительно человеку. Особенно предпочтительная фармацевтическая композиция по данному изобретению содержит одну или большее количество конструкций антитела по изобретению, предпочтительно в терапевтически эффективном количестве. Предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит подходящие препараты одного или большего количества (фармацевтически эффективных) носителей, стабилизаторов, вспомогательных веществ, разбавителей, солюбилизаторов, поверхностно-активных веществ, эмульгаторов, консервантов и/или адъювантов. Приемлемые компоненты композиции предпочтительно являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях. Фармацевтические композиции по изобретению включают в себя, но не ограничиваясь этим, жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции.

Композиции по изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый носитель. В общем, как используется в данном документе, термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает любой и все водные и неводные растворы, стерильные растворы, растворители, буферы, например, фосфатно-солевой буфер, ФСБ (PBS), воду, суспензии, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы увлажняющих агентов, липосомы, дисперсионные среды и покрытия, которые совместимы с фармацевтическим введением, в частности, с парентеральным введением. Применение таких сред и агентов в фармацевтических композициях хорошо известно в данной области техники, и композиции, содержащие такие носители, могут быть составлены при помощи хорошо известных общепринятых способов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие конструкцию антитела по изобретению, и дополнительно одно или большее количество вспомогательных веществ, таких как те, которые иллюстративно описаны в этом разделе и в любом другом месте данного документа. В этом отношении вспомогательные вещества могут применяться в изобретении для самых разных целей, таких как регулирование физических, химических или биологических свойств композиций, таких как регулирование вязкости, и/или в способах по изобретению для повышения эффективности и/или стабилизации таких препаратов и способов против деградации и ухудшения качества, связанных, например, со стрессовыми воздействиями, возникающими при изготовлении, транспортировке, хранении, предварительном приготовлении, введении и после этого.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция может содержать материалы препарата для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмотического давления, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции (см. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18<sup>th</sup> Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company). В таких вариантах осуществления изобретения подходящие материалы препарата могут включать в себя, но не ограничиваясь этим

аминокислоты, такие как глицин, аланин, глутамин, аспарагин, треонин, пролин, 2-фенилаланин, включая заряженные аминокислоты, предпочтительно лизин, ацетат лизина, аргинин, глутамат и/или гистидин;

противомикробные средства, такие как антибактериальные и противогрибковые средства;

антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, метионин, сульфит натрия или гидросульфит натрия;

буферные агенты, буферные системы и буферные агенты, которые применяются для поддержания физиологического значения pH композиции или несколько более низкого значения pH, как правило, в диапазоне pH от около 5 до около 8 или 9; примерами буферных агентов являются борат, бикарбонат, трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты, сукцинат, фосфат, гистидин и ацетат;

например, Трис-буфер с рН около 7,0-8,5, или ацетатный буфер с рН около 4,0-5,5;

неводные растворители, такие как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и пригодные для инъекций органические сложные эфиры, такие как этилолеат;

водные носители, включая воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевые и буферные среды;

биоразлагаемые полимеры, такие как сложные полиэфиры;

наполнители, такие как маннит или глицин;

хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА);

изотонические и абсорбирующие агенты;

комплексообразующие агенты, такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин);

наполнители;

моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины), углеводы могут быть невосстанавливающими сахарами, предпочтительно трегалозой, сахарозой, октасульфатом, сорбитом или ксилитом;

(низкомолекулярные) белки, полипептиды или белковые носители, такие как человеческий или бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, предпочтительно человеческого происхождения;

красители и ароматизаторы;

серосодержащие восстановители, такие как глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, [альфа]-монотиоглицерин и тиосульфат натрия;

разбавители;

эмульгаторы;

гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон;

солеобразующие противоионы, такие как натрий;

консерванты, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и т.п.; примерами являются бензалкония хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенэтиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода;

комплексы металлов, такие как Zn-белковые комплексы;

растворители и соразтворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль);

сахара и сахарные спирты, такие как трегалоза, сахароза, октасульфат, маннит, сорбит или ксилит, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, миоинозитола, галактоза, лактит, рибит, миоинозит, галактит, глицерин, циклитолы (например, инозит), полиэтиленгликоль; и многоатомные сахарные спирты;

суспендирующие агенты;

поверхностно-активные вещества или увлажняющие агенты, такие как плуроники, ПЭГ, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал; поверхностно-активные вещества могут быть детергентами, предпочтительно с молекулярной массой более чем 1,2 кДа и/или полиэфиром, предпочтительно с молекулярной массой более чем 3 кДа; неограничивающие примеры предпочтительных детергентов представляют собой Твин 20, Твин 40, Твин 60, Твин 80 и Твин 85; неограничивающими примерами предпочтительных полиэфиров являются ПЭГ 3000, ПЭГ 3350, ПЭГ 4000 и ПЭГ 5000;

агенты, улучшающие стабильность, такие как сахароза или сорбит;

агенты, повышающие осмотическое давление, такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно натрия или калия хлорид, маннит, сорбит;

основы для парентерального введения, включая раствор хлорида натрия, раствор Рингера с глюкозой, раствор глюкозы и хлорида натрия, растворы Рингера с лактатом или нелетучие масла;

основы для внутривенного введения, в том числе средства для восполнения жидкости и питательных веществ, средства для восполнения электролитов (например, на основе раствора Рингера с глюкозой).

Для специалистов в данной области техники будет очевидно, что различные компоненты фармацевтической композиции (например, перечисленные выше) могут оказывать различное влияние, например аминокислота может действовать как буфер, стабилизатор и/или антиоксидант; маннит может действовать как наполнитель и/или агент, повышающий осмотическое давление; хлорид натрия может действовать как основа для введения и/или агент, повышающий осмотическое давление; и т.п.

Предполагается, что композиция по изобретению может содержать, в дополнение к полипептиду по изобретению, определенному в данном документе, другие биологически активные агенты в зависимости от предполагаемого применения композиции. Такими агентами могут быть лекарственные средства, воздействующие на пищеварительную систему, лекарственные средства, действующие как цитостатические средства, лекарственные средства, предотвращающие гиперурикемию, лекарственные средства, подавляющие иммунные реакции (например, кортикостероиды), лекарственные средства, модулирующие воспалительный ответ, лекарственные средства, воздействующие на систему кровообращения и/или такие

агенты, как известные в данной области техники цитокины. Кроме того, предполагается, что конструкция антитела по данному изобретению пригодна для комбинированной терапии, т.е., в сочетании с другим противораковым лекарственным средством.

В некоторых вариантах осуществления изобретения оптимальная фармацевтическая композиция будет определяться специалистом в данной области техники в зависимости, например, от предполагаемого способа введения, формата доставки и желаемой дозировки. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo* конструкции антитела по изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения первичная основа или носитель в фармацевтической композиции может быть водным или неводным по своей природе. Например, подходящей основой или носителем может быть вода для инъекций, физиологический раствор хлорида натрия или искусственная спинномозговая жидкость, возможно, с добавлением других материалов, обычно применяемых в композициях для парентерального введения. Нейтральный буферный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином, представляют собой еще более типичные основы. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкция антитела по изобретению может быть приготовлена для хранения путем смешивания выбранной композиции с требуемой степенью чистоты с необязательными вспомогательными веществами (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше) в форме лиофилизированной таблетки или водного раствора. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления изобретения конструкция антитела по изобретению может быть составлена в виде лиофилизата с применением подходящих вспомогательных веществ, таких как сахароза.

Если предполагается парентеральное введение, то терапевтические композиции для применения в данном изобретении могут быть представлены в виде апиrogenного, подходящего для парентерального введения водного раствора, содержащего желаемую конструкцию антитела по изобретению в фармацевтически приемлемой основе. Особенно подходящим средством для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой конструкция антитела по изобретению составлена в виде стерильного изотонического раствора, с надлежащими консервантами. В некоторых вариантах осуществления изобретения препарат может включать в себя препарат желаемой молекулы с агентом, таким как подходящие для инъекций микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), шарики или липосомы, способные обеспечивать контролируемое или устойчивое высвобождение продукта, который может быть доставлен посредством инъекции депо. В некоторых вариантах осуществления изобретения может быть дополнительно применена гиалуроновая кислота, которая влияет на продолжительность нахождения в кровотоке. В некоторых вариантах осуществления изобретения для введения желаемой конструкции антитела могут применяться имплантируемые устройства для доставки лекарственного средства.

Для специалистов в данной области техники будут очевидны дополнительные фармацевтические композиции, в том числе препараты, содержащие конструкцию антитела по изобретению в препаратах с пролонгированной или контролируемой доставкой/высвобождением. Кроме того, специалистам в данной области техники известны способы разработки множества других средств пролонгированной или контролируемой доставки, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые шарики и инъекции депо. См., например, Международную патентную заявку № PCT/US93/00829, в которой описано контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с пролонгированным высвобождением могут включать в себя полупроницаемые полимерные матрицы в форме профилированных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матрицы с пролонгированным высвобождением могут включать в себя полиэфиры, гидрогели, полилактиды (как описано в патенте США № 3773919 и публикации Европейской патентной заявки № EP 058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 2: 547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 и Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12: 98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (публикация Европейской патентной заявки № EP 133988). Кроме того, композиции с пролонгированным высвобождением могут включать в себя липосомы, которые могут быть получены любым из нескольких способов, известных в данной области техники. См., например, Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 3688-3692; Публикации Европейских патентных заявок №№ EP 036676; EP 088046 и EP 143949.

Дополнительно конструкцию антитела можно захватывать в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или путем межфазной полимеризации (например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно), в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и наночапсулы) или в макроэмульсиях. Такие методы раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo*, обычно предоставляются в виде стерильных препаратов. Стерилизацию можно осуществлять путем фильтрации сквозь мембраны для

стерильной фильтрации. Если композицию лиофилизуют, то стерилизация с применением этого метода может быть проведена до или после лиофилизации и разведения. Композиции для парентерального введения могут храниться в лиофилизированной форме или в растворе. Композиции для парентерального введения обычно помещают в емкость, снабженную стерильным портом доступа, например, пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожной инъекции.

Другой аспект изобретения включает в себя самобуферизованную конструкцию антитела по изобретению, которая может быть применена в качестве фармацевтических композиций, как описано в международной патентной заявке WO 06138181A2 (PCT/US 2006/022599). Разнообразный выбор доступен в отношении материалов и способов для стабилизации и составления белка, подходящих в этом отношении, например, Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," *Pharm Res.* 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" в: *RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE*, Carpenter and Manning, eds. *Pharmaceutical Biotechnology.* 13: 61-84 (2002) и Randolph et al., "Surfactant-protein interactions", *Pharm Biotechnol.* 13: 159-75 (2002), см., в частности, разделы, относящиеся к вспомогательным веществам и способам их получения для самобуферизованных белковых составов в соответствии с данным изобретением, особенно в отношении белковых фармацевтических продуктов и способов для ветеринарного и/или медицинского применения.

Соли могут применяться в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, например, для регулирования ионной силы и/или осмотического давления препарата и/или для улучшения растворимости и/или физической стабильности белка или другого ингредиента композиции в соответствии с изобретением. Как известно, ионы могут стабилизировать нативное состояние белков путем связывания с заряженными остатками на поверхности белка и путем экранирования заряженных и полярных групп в белке и снижения силы их электростатических взаимодействий, взаимодействий притяжения и отталкивания. Дополнительно, ионы могут стабилизировать денатурированное состояние белка путем связывания, в частности, с денатурированными пептидными связями (-CONH) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке может уменьшать межмолекулярные электростатические взаимодействия и тем самым предотвращать или уменьшать агрегацию белка и не-растворимость.

Виды ионов значительно различаются по их воздействию на белки. Был разработан ряд категориальных ранжировок ионов и их влияния на белки, которые могут быть применены при разработке фармацевтических композиций в соответствии с изобретением. Одним из примеров является ряд Гофмейстера, в котором ионные и полярные неионные растворенные вещества ранжированы по их влиянию на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космотропными". Дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропными". Космотропы обычно применяются в высоких концентрациях (например, больше чем 1 молярный сульфат аммония) для осаждения белков из раствора ("высаливание"). Хаотропы обычно применяются для денатурации и/или для солиubilизации белков ("всаливание"). Относительная эффективность ионов с точки зрения "всаливания" и "высаливания" определяет их положение в ряду Гофмейстера.

Свободные аминокислоты могут быть применены в препаратах конструкции антитела по изобретению в соответствии с различными вариантами осуществления изобретения в качестве наполнителей, стабилизаторов и антиоксидантов, а также для других стандартных целей. Лизин, пролин, серин и аланин могут быть применены для стабилизации белков в препарате. Глицин пригоден для лиофилизации, чтобы обеспечить правильную структуру и свойства таблетки. Аргинин может быть пригоден для подавления агрегации белка в жидких и лиофилизированных препаратах. Метионин пригоден в качестве антиоксиданта.

Полиолы включают в себя сахара, например маннит, сахарозу и сорбит, и многоатомные спирты, например, такие как глицерин и пропиленгликоль, и для целей данного документа также полиэтиленгликоль (ПЭГ) и родственные вещества. Полиолы являются космотропами. Они представляют собой подходящие стабилизирующие агенты как в жидких, так и в лиофилизированных препаратах для защиты белков от процессов физической и химической деградаци. Кроме того, полиолы подходят для регулирования осмотического давления препаратов. Среди полиолов, пригодных для отдельных вариантов осуществления изобретения, маннит, обычно применяемый для обеспечения структурной стабильности таблетки в лиофилизированных препаратах. Он обеспечивает структурную стабильность таблетки. Обычно его применяют с лиопротектором, например, сахарозой. Сорбитол и сахароза являются одними из предпочтительных агентов для регулирования осмотического давления и в качестве стабилизаторов для защиты от стрессов, связанных с замораживанием-оттаиванием во время транспортировки или подготовки балка в ходе производственного процесса. Восстанавливающие сахара (содержащие свободные альдегидные или кетонные группы), такие как глюкоза и лактоза, могут гликировать поверхностные остатки лизина и аргинина. Поэтому они обычно не входят в число предпочтительных полиолов для применения в соответствии с изобретением. Кроме того, сахара, которые образуют такие реакционноспособные вещества, такие как сахароза, которая в кислых условиях гидролизует до фруктозы и глюкозы и, следовательно, вызывают гликирование, также не входят в число предпочтительных в этом отношении полиолов по изо-



бретению. ПЭГ пригоден для стабилизации белков и в качестве криопротектора и в этом отношении может применяться в изобретении.

Варианты препаратов конструкции антитела по изобретению дополнительно содержат поверхностно-активные вещества. Молекулы белка могут быть восприимчивы к адсорбции на поверхностях и денатурации с последующей агрегацией на границах воздуха-жидкости, твердого вещества-жидкости и жидкости-жидкости. Масштаб этих эффектов обычно обратно пропорционален концентрации белка. Масштаб таких вредных взаимодействий обычно обратно пропорционален концентрации белка, причем они обычно усугубляются физическим перемешиванием, например, возникающим во время транспортировки и обращения с продуктом. Поверхностно-активные вещества обычно применяются для предотвращения, минимизации или уменьшения адсорбции на поверхности. Подходящие в этом отношении поверхностно-активные вещества по изобретению включают в себя полисорбат 20, полисорбат 80, другие сложные эфиры жирных кислот и полиэтоксилатов сорбитана и полоксамер 188. Кроме того, поверхностно-активные вещества обычно применяются для контроля конформационной стабильности белка. Примененные поверхностно-активных веществ в этом отношении специфично для белка, поскольку любое конкретное поверхностно-активное вещество обычно стабилизирует некоторые белки и дестабилизирует другие.

Полисорбаты восприимчивы к окислительной деградации и часто поставляются содержащими достаточное количество пероксидов, чтобы вызвать окисление боковых цепей остатков белка, особенно метионина. Следовательно, полисорбаты следует применять с осторожностью, а в случае их применения следует применять наименьшую эффективную концентрацию. В этом отношении полисорбаты представляют общее правило, согласно которому вспомогательные вещества следует применять в наименьших эффективных концентрациях.

Варианты препаратов конструкции антитела по изобретению дополнительно содержат один или большее количество антиоксидантов. Вредное окисление белков в фармацевтических композициях в определенной степени можно предотвратить, поддерживая надлежащие уровни кислорода в окружающей среде и температуру и избегая воздействия света. Кроме того, антиоксидантные вспомогательные вещества могут применяться для предотвращения окислительной деградации белков. Среди полезных в этом отношении антиоксидантов восстановители, поглотители кислорода/свободных радикалов и хелатирующие агенты. Антиоксиданты для применения в композициях терапевтических белков в соответствии с изобретением предпочтительно являются водорастворимыми и сохраняют свою активность на протяжении всего срока годности продукта. В этом отношении ЭДТА является предпочтительным антиоксидантом в соответствии с изобретением. Антиоксиданты могут повреждать белки. Например, восстанавливающие агенты, в частности, такие как глутатион, могут разрывать внутримолекулярные дисульфидные связи. Таким образом, антиоксиданты для применения в изобретении отбираются, среди прочего, с тем, чтобы устранить или в достаточной степени уменьшить вероятность того, что они сами повредят белки в препарате.

Композиции в соответствии с изобретением могут содержать ионы металлов, которые являются кофакторами белка и которые необходимы для образования координационных комплексов белка, такие как цинк, необходимый для образования некоторых суспензий инсулина. Кроме того, ионы металлов могут подавлять некоторые процессы, в результате которых происходит деградация белка. Однако ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, в результате которых происходит деградация белка. Ионы магния (10-120 мМ) могут применяться для подавления изомеризации аспарагиновой кислоты в изоаспарагиновую кислоту. Ионы  $\text{Ca}^{+2}$  (до 100 мМ) могут повысить стабильность дезоксирибонуклеазы человека. Однако  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  и  $\text{Zn}^{+2}$ , могут дестабилизировать рекомбинантную человеческую ДНКазу (rhDNase). Аналогично,  $\text{Ca}^{+2}$  и  $\text{Sr}^{+2}$  могут стабилизировать фактор VIII, который может быть дестабилизирован  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  и  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  и  $\text{Fe}^{+2}$ , а его агрегация может быть усилена ионами  $\text{Al}^{+3}$ . Варианты препаратов конструкции антитела по изобретению содержат также один или большее количество консервантов. Консерванты необходимы при разработке многодозовых препаратов для парентерального применения, которые предусматривают более одного извлечения из одной и той же емкости. Их основная функция заключается в подавлении роста микроорганизмов и обеспечении стерильности продукта на протяжении всего срока хранения или срока применения лекарственного продукта. Обычно применяемые консерванты включают в себя бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты имеют долгую историю применения в низкомолекулярных средствах для парентерального применения, разработка белковых препаратов, содержащих консерванты, может быть сложной задачей. Консерванты почти всегда оказывают дестабилизирующее воздействие (агрегация) на белки, и это стало основным фактором, ограничивающим их применения в многодозовых препаратах белка. На сегодняшний день большинство белковых лекарственных средств составлено только для однократного применения. Однако, если возможны многодозовые препараты, у них есть дополнительное преимущество, обеспечивающее удобство для пациента и повышенную конкурентоспособность. Хорошим примером является гормон роста человека (hGH), для которого разработка препаратов с консервантами привела к коммерциализации более удобных, многодозовых инъекционных форм в виде ручки. В настоящее время на рынке доступно по меньшей мере четыре таких устройства в виде ручки, содержащие препараты hGH с консерван-

тами. Norditropin (жидкий, Novo Nordisk), Nutropin AQ (жидкий, Genentech) & Genotropin (лиофилизированный-двухкамерный картридж, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, тогда как Somatropin (Eli Lilly) составлен с м-крезолом. При составлении и разработке лекарственных форм с консервантами необходимо учитывать несколько аспектов. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном продукте должна быть оптимизирована. Это требует тестирования конкретного консерванта в лекарственной форме с диапазонами концентраций, которые обеспечивают противомикробное действие без ущерба для стабильности белка.

Как и следовало ожидать, разработка жидких препаратов, содержащих консерванты, более сложна, чем лиофилизированных препаратов. Лиофилизированные продукты можно лиофилизировать без консерванта и разводить разбавителем, содержащим консервант, во время применения. Это сокращает время, в течение которого консервант контактирует с белком, что значительно минимизирует связанные с этим риски для стабильности. При применении жидких препаратов эффективность и стабильность консерванта должны сохраняться в течение всего срока хранения продукта (приблизительно от 18 до 24 месяцев). Важно отметить, что эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в конечном препарате, содержащем активное лекарственное средство и все вспомогательные компоненты.

Дополнительно конструкции антител, описанные в данном изобретении, могут быть составлены в виде иммунолипосом. "Липосома" представляет собой небольшую везикулу, состоящую из различных видов липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, подходящую для введения лекарственного средства млекопитающему. Компоненты липосомы обычно располагаются в двухслойном пласте, аналогично расположению липидов биологических мембран. Липосомы, содержащие конструкцию антитела, получают способами, известными в данной области техники, такими как описано в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); патенты США №№ 4485045 и 4544545; и WO 97/38731. Липосомы с увеличенным временем нахождения в кровотоке описаны в патенте США № 5013556. Особенно подходящие липосомы могут быть получены методом обращенно-фазового испарения с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и дериватизированный фосфатидилэтанолламин ПЭГ, ПЭГ-ФЭ (PEG-PE). Липосомы экструдируют сквозь фильтры с определенным размером пор, чтобы получить липосомы требуемого диаметра. Фрагменты Fab' конструкции антитела по данному изобретению могут быть конъюгированы с липосомами, как описано в Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982), посредством введения в реакцию дисульфидного обмена. В липосоме необязательно содержится химиотерапевтическое средство (См. Gabison et al. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989)).

После того, как фармацевтическая композиция была составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла или в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие препараты могут храниться в готовой к употреблению форме или в форме (например, лиофилизированной), которую разводят перед введением.

Биологическая активность фармацевтической композиции, определенной в данном изобретении, может быть определена, например, в анализе цитотоксичности, как описано в следующих примерах, в WO 99/54440 или Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother., 20 (2005), 1-12). "Эффективность" или "эффективность in vivo", как используется в данном документе, относится к реакции на терапию фармацевтической композицией по изобретению, оцененной с применением, например, стандартизированных критериев ответа Национального Института рака, НИР (NCI). Эффективность или эффективность in vivo терапии с применением фармацевтической композиции по изобретению относится к эффективности композиции по прямому назначению, т.е., к способности композиции вызывать желаемый эффект, т.е., истощение патологических клеток, например опухолевых клеток. Эффективность in vivo можно контролировать при помощи проверенных стандартных методов для соответствующих нозологических единиц, в том числе, но не ограничиваясь этим, при помощи подсчета лейкоцитов, дифференциалов, сортировки клеток с активированной флуоресценцией, аспирации костного мозга. Дополнительно могут использоваться различные, специфические для заболевания показатели клинической химии и другие проверенные стандартные методы. Кроме того, могут быть применены компьютерная томография, рентгеновская томография, ядерная магнитно-резонансная томография (например, для оценки ответа на основе критериев Национального Института рака [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. 1999 Apr;17(4): 1244]), сканирующая позитронно-эмиссионная томография, подсчет количества лейкоцитов, дифференциалы, сортировка клеток с активированной флуоресценцией, аспирация костного мозга, биопсия/гистология лимфатических узлов и различные показатели клинической химии, специфические для лимфомы (например, лактатдегидрогеназа), и другие проверенные стандартные методы.

Другой важной задачей при разработке лекарственных средств, таких как фармацевтическая композиция по изобретению, является предсказуемая модуляция фармакокинетических свойств. С этой целью может быть установлен фармакокинетический профиль потенциального лекарственного средства, т.е., профиль фармакокинетических показателей, которые влияют на способность конкретного лекарственно-

го средства лечить данное состояние. Фармакокинетические показатели лекарственного средства, влияющие на способность лекарственного средства лечить определенное заболевание, включают в себя, но не ограничиваясь этим: период полувыведения, объем распределения, пресистемный метаболизм в печени и степень связывания с сывороткой крови. Каждый из указанных выше показателей может влиять на эффективность конкретного лекарственного агента.

"Период полувыведения" означает время, за которое 50% вводимого лекарственного средства элиминируется посредством биологических процессов, например, метаболизма, экскреции и т.д. Под "пресистемным метаболизмом в печени" подразумевается склонность лекарственного средства метаболизироваться при первом контакте с печенью, т.е., во время первого прохождения через печень. "Объем распределения" означает степень удерживания лекарственного средства во всех биологических купе организма, таких как, например, внутриклеточные и внеклеточные пространства, ткани и органы и т.д., а также распределение препарата в этих биологических купе. "Степень связывания с сывороткой крови" означает склонность лекарственного средства к взаимодействию с белками сыворотки крови и его связывание с белками сыворотки крови, такими как альбумин, что приводит к снижению или потере биологической активности лекарственного средства.

Кроме того, фармакокинетические параметры включают в себя биодоступность, латентный период ( $T_{lag}$ ),  $T_{max}$ , скорость абсорбции, в большей степени момент начала действия и/или  $C_{max}$  для данного количества вводимого лекарственного средства. "Биодоступность" означает количество лекарственного средства в биологическом купе крови. "Латентный период" означает временную задержку между введением лекарственного средства и его обнаружением и измеримостью в крови или плазме. " $T_{max}$ " представляет собой время, в течение которого достигается максимальная концентрация лекарственного средства в крови, а " $C_{max}$ " представляет собой максимальную концентрацию в крови, полученную при применении данного лекарственного средства. На время достижения концентрации лекарственного средства в крови или ткани, которая требуется для его биологического действия, влияют все показатели. Фармакокинетические параметры конструкций биспецифических антител, проявляющих перекрестно-видовую специфичность, которые могут быть определены в доклиническом тестировании на животных у приматов, не относящихся к шимпанзе, как описано выше, дополнительно изложены, например, в публикации Schlereth et al. (*Cancer Immunol. Immunother.*, 20 (2005), 1-12).

Один вариант осуществления изобретения предусматривает конструкцию антитела по изобретению или конструкцию антитела, полученную в соответствии со способом по изобретению, для применения при предупреждении, лечении или облегчении состояния при опухоли или раковом заболевании или метастатическом раковом заболевании.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения указанная опухоль или раковое заболевание представляет собой заболевание в форме солидной опухоли.

Препараты, описанные в данном документе изобретения, пригодны в качестве фармацевтических композиций при лечении, улучшении и/или предупреждении патологического медицинского состояния, как описано в данном изобретении, у пациента, нуждающегося в этом. Термин "лечение" относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическому или превентивным мерам. Лечение включает в себя применение или введение препарата в организм, выделенную ткань или клетку пациента, у которого присутствует заболевание/расстройство, симптом заболевания/расстройства или предрасположенность к заболеванию/расстройству, с целью излечения, лечения, смягчения, облегчения, модификации, устранения, улучшения, ослабления или влияния на заболевание, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию.

Как используется в данном изобретении, термин "улучшение" относится к любому улучшению состояния при заболевании у пациента с опухолью или раком или метастатическим раком, как указано в данном документе ниже, путем введения конструкции антитела согласно изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. Такое улучшение дополнительно можно рассматривать как замедление или остановку прогресса опухоли или рака или метастатического рака у пациента. Как используется в данном изобретении, термин "предупреждение" означает предотвращение возникновения или рецидива у пациента с опухолью или раком или метастатическим раком, как указано в данном документе ниже, путем введения конструкции антитела в соответствии с изобретением субъекту, нуждающемуся в этом.

Термин "заболевание" относится к любому состоянию, при котором лечение описанной в данном изобретении конструкцией антитела или фармацевтической композицией могло бы принести пользу. Это включает в себя хронические и острые расстройства или заболевания, включая те патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающее к рассматриваемому заболеванию.

"Новообразование" представляет собой аномальный рост ткани, обычно, но не всегда образующей опухолевое образование. Если также образуется опухолевое образование, его обычно называют "опухолью". Новообразования или опухоли могут быть доброкачественными, потенциально злокачественными (предраковыми) или злокачественными. Злокачественные новообразования обычно называют раком. Они обычно вторгаются и разрушают окружающую ткань и могут образовывать метастазы, т.е. они распространяются на другие части, ткани или органы организма. Следовательно, термин "метастатический рак" включает в себя метастазы в другие ткани или органы, кроме исходной опухоли. Лимфомы и лейкозы

представляют собой лимфоидные новообразования. Для целей данного изобретения они также включены в термины "опухоль" или "рак".

В предпочтительном варианте осуществления изобретения опухолевое или раковое заболевание представляет собой заболевание в форме солидной опухоли и метастатическое раковое заболевание, происходящее из вышеперечисленных.

Предпочтительные опухолевые или раковые заболевания в связи с данным изобретением выбраны из группы, состоящей из рака молочной железы, карциноида, рака шейки матки, рака колоректального отдела, рака эндометрия, рака желудка, рака головы и шеи, мезотелиомы, рака печени, рака легких, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака кожи, рака почек и рака желудка. Более предпочтительно опухолевое или раковое заболевание, которое предпочтительно является заболеванием в форме солидной опухоли, может быть выбрано из группы, состоящей из рака яичников, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, рака легких, рака желудка и тройного отрицательного рака молочной железы. Метастатическое раковое заболевание может происходить из любого из вышеперечисленных.

Кроме того, изобретение относится к способу лечения или облегчения опухоли или онкологического заболевания или метастатического ракового заболевания, включающему стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, конструкции антитела по изобретению или конструкции антитела, полученной в соответствии со способом по изобретению.

Термины "субъект, нуждающийся в этом" или "нуждающиеся в лечении" включают в себя тех, у кого уже присутствует расстройство, а также тех, у кого это расстройство должно быть предотвращено. Субъект, нуждающийся в этом, или "пациент", включает в себя человека и других млекопитающих субъектов, которые получают профилактическое или терапевтическое лечение.

Конструкция антитела по изобретению, как правило, предназначена для конкретных путей и способов введения, для конкретных дозировок и частоты введения, для конкретного лечения конкретных заболеваний, с диапазонами биологической доступности и устойчивости, среди прочего. Материалы композиции предпочтительно составлены в концентрациях, приемлемых для места введения.

Таким образом, препараты и композиции могут быть разработаны в соответствии с изобретением для введения любым подходящим способом введения. В контексте данного изобретения способы введения включают в себя, но не ограничиваясь этим,

местные способы (такие как накожный, ингаляционный, назальный, офтальмологический, аурикулярный/ушной, вагинальный, на слизистую оболочку);

энтеральные способы (такие как пероральный, гастроинтестинальный, сублингвальный, сублабиальный, буккальный, ректальный) и

парентеральные способы (такие как внутривенный, внутриартериальный, внутрикостный, внутримышечный, внутримозговой, интрацеребровентрикулярный, эпидуральный, интратекальный, подкожный, внутрибрюшинный, экстраамниотический, внутрисуставный, внутрисердечный, внутрикожный, внутриочаговый, внутриматочный, внутривульварный, интравитреальный, трансдермальный, интраназальный, трансмукозальный, внутрисуставной, интралиминальный).

Фармацевтические композиции и конструкция антитела по данному изобретению особенно пригодны для парентерального введения, например, подкожного или внутривенного введения, например, путем инъекции, такой как инъекция болюса, или путем инфузии, такой как непрерывная инфузия. Фармацевтические композиции можно вводить с применением медицинского устройства. Примеры медицинских устройств для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США №№ 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851; и 5399163.

В частности, в данном изобретении предложен непрерывное введение подходящей композиции. В качестве неограничивающего примера непрерывное или практически непрерывное, т.е., длительное введение, может быть реализовано при помощи небольшой насосной системы, которую носит пациент, для измерения притока терапевтического агента в организм пациента. Фармацевтическую композицию, содержащую конструкцию антитела по изобретению, можно вводить с применением указанных насосных систем. Такие насосные системы обычно известны в данной области техники и обычно предполагают периодическую замену картриджей, содержащих терапевтический агент для введения. При замене картриджа в такой насосной системе может произойти временное прерывание в противном случае непрерывного потока терапевтического агента в организм пациента. В таком случае фаза введения перед заменой картриджа и фаза введения после замены картриджа все еще будут рассматриваться в значении фармацевтических средств и способов согласно изобретению, вместе составляющих одно "непрерывное введение" такого терапевтического агента.

Непрерывное или беспрерывное введение конструкций антител по изобретению может осуществляться внутривенно или подкожно посредством устройства для введения жидкости или небольшой насосной системы, оснащенной механизмом подачи жидкости, который выводит жидкость из резервуара, и пусковым механизмом для приведения в действие механизма для подачи. Системы насосов для подкожного введения могут быть оборудованы иглой или канюлей для проникновения сквозь кожу пациента и

введения подходящей композиции в организм пациента. Указанные насосные системы могут быть непосредственно закреплены или прикреплены к коже пациента независимо от вены, артерии или кровеносного сосуда, тем самым обеспечивая прямой контакт между насосной системой и кожей пациента. Насосная система может быть прикреплена к коже пациента в течение периода от 24 ч до нескольких дней. Насосная система может быть небольшого размера с резервуаром для небольших объемов. В качестве неограничивающего примера, объем резервуара для подходящей фармацевтической композиции для введения может составлять от 0,1 до 50 мл.

Кроме того, непрерывное введение может осуществляться трансдермально при помощи пластыря, закрепленного на коже и периодически заменяемого. Специалисту в данной области техники известны системы пластырей для доставки лекарственных средств, подходящие для этой цели. Следует отметить, что трансдермальное введение особенно подходит для непрерывного введения, поскольку замена первого израсходованного пластыря может быть успешно произведена одновременно с размещением нового второго пластыря, например, на поверхности кожи, непосредственно примыкающей к первому израсходованному пластырю, и непосредственно перед удалением первого израсходованного пластыря. Не возникает проблем с прерыванием потока или сбоем элемента питания.

Если фармацевтическая композиция лиофилизована, то лиофилизованный материал сначала разводят в соответствующей жидкости перед введением. Лиофилизованный материал может быть разведен, например, в бактериостатической воде для инъекций, БВИ (BWF1), физиологическом растворе, фосфатно-солевом буфере, ФСБ (PBS) или в том же препарате, что и белок до лиофилизации.

Композиции по данному изобретению можно вводить субъекту в подходящей дозе, которая может быть определена, например, путем исследований с повышением дозы при введения увеличивающихся доз конструкции антитела по изобретению, которая проявляет перекрестно-видовую специфичность, описанной в данном изобретении, приматам, не относящимся к шимпанзе, например, макаку. Как указано выше, конструкция антитела по изобретению, проявляющая перекрестно-видовую специфичность, описанная в данном изобретении, преимущественно может быть применена в идентичной форме при доклиническом тестировании на приматах, не относящимся к шимпанзе, и в качестве лекарственного средства у человека. Схема введения будет определяться лечащим врачом и клиническими факторами. Как известно в области медицины, дозы для любого конкретного пациента зависят от многих факторов, включая размеры пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и способ введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства, вводимые параллельно.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется как количество, достаточное для достижения или, по меньшей мере, частичного достижения желаемого эффекта. Термин "терапевтически эффективная доза" определяется как количество, достаточное для излечения или, по меньшей мере, частичной остановки заболевания и его осложнений у пациента, уже страдающего этим заболеванием. Количества или дозы, эффективные для такого применения, будут зависеть от состояния, подлежащего лечению (показание), вводимой конструкции антитела, терапевтического контекста и целей, тяжести заболевания, предшествующей терапии, анамнеза пациента и реакции на терапевтический агент, способа введения, размера (масса тела, поверхность тела или размер органа) и/или состояния (возраст и общее состояние здоровья) пациента, а также общего состояния собственной иммунной системы пациента. Надлежащая доза может быть скорректирована по решению лечащего врача, таким образом, что ее можно вводить пациенту один раз или в виде серии доз и до достижения оптимального терапевтического эффекта.

Типичная доза может варьироваться от около 0,1 мкг/кг до около 30 мг/кг или более, в зависимости от факторов, указанных выше. В конкретных вариантах осуществления изобретения доза может варьироваться от 1,0 мкг/кг до примерно 20 мг/кг, необязательно, от 10 мкг/кг до около 10 мг/кг или от 100 мкг/кг до около 5 мг/кг.

Терапевтически эффективное количество конструкции антитела по изобретению предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты или продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращению ухудшения или инвалидности вследствие заболевания. При лечении опухолей, экспрессирующих МЗЛН (MSLN), терапевтически эффективное количество конструкции антитела по изобретению, например, конструкции антитела против МЗЛН (MSLN)/против КД3 (CD3), предпочтительно подавляет рост клеток или рост опухоли по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80% или по меньшей мере около 90% относительно нелеченных пациентов. Способность соединения подавлять рост опухоли можно оценить на животной модели, позволяющей прогнозировать эффективность в отношении опухолей человека.

Фармацевтическую композицию можно вводить в качестве монотерапии или, при необходимости, в сочетании с дополнительными терапевтическими средствами, такими как противораковые терапевтические средства, например, другие белковые и небелковые препараты. Эти лекарственные средства можно вводить одновременно с композицией, содержащей конструкцию антитела по изобретению, как определено в данном изобретении, или по отдельности, до или после введения указанной конструкции антите-

ла, в пределах определенных промежутков и доз.

Как используется в данном изобретении, термин "эффективная и нетоксичная доза" относится к переносимой дозе конструкции антитела по изобретению, которая достаточно высока, чтобы вызвать истощение патологических клеток, ликвидацию опухоли, уменьшение размера опухоли или стабилизацию заболевания без или по существу без значительных токсических эффектов. Такие эффективные и нетоксичные дозы могут быть определены, например, в исследованиях с повышением дозы, описанных в данной области техники, и должны быть ниже дозы, вызывающей серьезные побочные эффекты (ограничивающая дозу токсичность, ОДТ (DLT)).

Как используется в данном изобретении, термин "токсичность" относится к токсическому воздействию препарата, проявляющемуся побочными эффектами или тяжелыми побочными эффектами. Такие побочные эффекты могут относиться к непереносимости препарата в целом и/или к местной непереносимости после введения. Кроме того, токсичность может включать в себя тератогенный или канцерогенный эффект лекарственного средства.

Термины "безопасность", "безопасность *in vivo*" или "переносимость", как они используются в данном документе, определяют введение лекарственного средства, которое не вызывает тяжелых побочных эффектов непосредственно после введения (местная переносимость) и в течение периода последующего наблюдения препарата. "Безопасность", "безопасность *in vivo*" или "переносимость" можно оценивать, например, через регулярные промежутки времени в ходе лечения и в течение периода наблюдения. Показатели включают в себя клиническую оценку, например, проявления со стороны органов, и скрининг на предмет отклонений лабораторных показателей. Может быть проведена клиническая оценка, и отклонения от нормальных результатов, зарегистрированы/классифицированы в соответствии со стандартами Общих критериев токсичности Национального института рака, ОКТ-НИР (NCI-CTC) и/или Медицинского словаря регуляторной деятельности, МСРД (MedDRA). Проявления со стороны органов могут включать в себя такие критерии, как аллергия/иммунология, кровь/костный мозг, сердечная аритмия, коагуляция и т.п., как указано, например, в Общих критериях терминологии для побочных эффектов версии 3.0, ОКТПЭ (CTCAE). Лабораторные показатели, которые могут быть проверены, включают в себя, например, гематологию, клиническую химию, профиль коагуляции, анализ мочи и исследование других жидкостей организма, таких как сыворотка, плазма, лимфоидная или спинномозговая жидкость, ликвор и т.п. Таким образом, безопасность может быть оценена, например, путем медицинского осмотра, методами визуализации (например, ультразвуковым, рентгенографическим, компьютерной томографией, магнитно-резонансной томографией, МРТ (MRI), другими способами с применением технических устройств (например, электрокардиограмма), по основным показателям жизнедеятельности, путем измерения лабораторных показателей и регистрации побочных эффектов. Например, побочные эффекты у приматов, не относящихся к шимпанзе, при применении и в способах согласно изобретению могут быть исследованы гистопатологическими и/или гистохимическими методами.

Кроме того, вышеуказанные термины упоминаются, например, в Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived Pharmaceuticals S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; ICH Steering Committee meeting on July 16, 1997.

В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к набору, содержащему конструкцию антитела по изобретению, конструкцию антитела, полученную в соответствии со способом по изобретению, полинуклеотид по изобретению, вектор по изобретению и/или клетку-хозяина по изобретению.

В контексте данного изобретения термин "набор" означает два или большее количество компонентов, один из которых соответствует конструкции антитела, фармацевтической композиции, вектору или клетке-хозяину по изобретению, совместно упакованных в емкость-реципиент или иначе. Таким образом, набор можно описать как набор продуктов и/или емкостей, достаточных для достижения определенной цели, который может продаваться как единое целое.

Набор может содержать один или большее количество реципиентов (таких как флаконы, ампулы, емкости, шприцы, бутылки, пакеты) любой подходящей формы, размера и из любого подходящего материала (предпочтительно водонепроницаемого, например, пластик или стекло), содержащие конструкцию антитела или фармацевтическую композицию по данному изобретению в соответствующей дозировке для введения (см. выше). Набор может дополнительно содержать указания по применению (например, в виде брошюры или инструкции по применению), средства для введения конструкции антитела по данному изобретению, такие как шприц, насос, инфузор и т.п., средства для разведения конструкции антитела по изобретению и/или средства для разведения конструкции антитела по изобретению.

Кроме того, в изобретении предложены наборы для модуля одноразового введения. Набор по изобретению может дополнительно содержать первый реципиент, содержащий сухую/лиофилизированную конструкцию антитела, и второй реципиент, содержащий водный препарат. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложены комплекты, содержащие предварительно заполненные однокамерные и многокамерные шприцы (например, шприцы с жидкостью и шприцы с лиофилизатом).

На чертежах проиллюстрированы:

Фиг. 1: Схематическое представление химеры МЗЛН (MSLN) человека-мыши. Химера МЗЛН

(MSLN) была сгенерирована с 6-мя различными обменами на протяжении последовательности от МЗЛН (MSLN) человека к мыши. Соответствующие варианты экспрессированы на поверхности клонов клеток ЯКХ (CHO) (E1-E6) (см. Пример 1).

Фиг. 2: Перекрестная реактивность конструкций антител против МЗЛН (MSLN) по данным проточной цитометрии: связывание с МЗЛН (MSLN) и КД3 (CD3) человека и макака (см. Пример 4).

Фиг. 3: Анализ конструкций антител против МЗЛН (MSLN) методом проточной цитометрии: связывание с вариантами v2 и v6 человека (см. Пример 4).

Фиг. 4: Активность перенацеливания конструкциями биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КД3 (CD3) стимулированных CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток человека против трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO), измеренная в 18-часовом анализе высвобождения <sup>51</sup>Cr (соотношение эффектора к мишени 10:1).

Фиг. 5: Активность перенацеливания конструкциями биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КД3 (CD3) стимулированных CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток человека против МЗЛН (MSLN)-положительного OVCAR-8, измеренная в 18-часовом анализе с высвобождением <sup>51</sup>Cr (соотношение эффектора к мишени 10:1).

Фиг. 6: Активность перенацеливания конструкциями биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КД3 (CD3) Т-клеток в нестимулированных МКПК (PBMC) человека (CD14<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>) против трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO) в отсутствие и в присутствии растворимого МЗЛН (MSLN), измеренная в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе СКАФ (FACS) (соотношение эффектора к мишени 10:1).

Фиг. 7: Активность перенацеливания конструкциями биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КД3 (CD3) Т-клеток в нестимулированных МКПК (PBMC) человека (CD14<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>) против МЗЛН (MSLN)-положительной клеточной линии человека OVCAR-8, измеренная в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе СКАФ (FACS).

Фиг. 8: Подтверждение способности перекрестно реагирующих конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КД3 (CD3) перенацеливать Т-клетки макака против трансфектированных МЗЛН (MSLN) макака клеток ЯКХ (CHO) в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе СКАФ (FACS), проведенное с применением линии Т-клеток макака LnPx4119 в качестве эффекторных Т-клеток (соотношение эффектора к мишени 10:1).

Фиг. 9: Зазор активности между мономерной и димерной изоформами конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КД3 (CD3) при перенацеливании Т-клеток в стимулированных CD8<sup>+</sup> человека эффекторных Т-клетках против трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO), измеренный в 18-часовом анализе высвобождения <sup>51</sup>Cr (соотношение эффектора к мишени 10:1).

Фиг. 10: Стабильность конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КД3 (CD3) после инкубации в течение 96 ч в плазме крови человека. 18-часовой анализ на основе <sup>51</sup>Cr. Эффекторные клетки: стимулированные обогащенные CD8 Т-клетки человека. Клетки-мишени: трансфектированные hu МЗЛН (MSLN) клетки ЯКХ (CHO). Соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням (Э:М): 10:1. ВiTE, как указано.

Фиг. 11: Гомогенность белка для конструкций антител по изобретению, проанализированная при помощи высокоэффективной катионообменной хроматографии, КОХ (СIEX).

Фиг. 12: Поверхностная гидрофобность конструкций биспецифических антител по изобретению, проанализированная при помощи хроматографии с гидрофобным взаимодействием, ХГВ (HIC) в проточном режиме.

Фиг. 13: Превращение мономера в димер после трех циклов замораживания/оттаивания.

Фиг. 14: Превращение мономера в димер после 7 дней инкубации с концентрацией 250 мкг/мл.

Фиг. 15: Оценка независимой от мишени активации Т-клеток конструкциями антител против Мезотелина, МЗ (MS) HLE ВiTE®. 2(a) конструкция антитела по изобретению в 48-часовом анализе активации с МКПК (PBMC) человека (3x); HLE Bite® серийные разведения (начиная с 20 нМ; 1:5, 7x плюс холостой); без или с блокировкой FcR [10 мг/мл huIgG (Kiovog, Baxter)]; определение при помощи СКАФ (FACS) экспрессии CD69 и CD25 [не показано] на CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Т-клетках. 2 (b) Конструкция антитела гетеро-Fc в 48-часовом анализе активации с МКПК (PBMC) человека и обедненными CD14<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> клетками МКПК (PBMC) (3x); HLEBite® серийные разведения (начиная с 20 нМ; 1:5, 7x плюс холостой); определение при помощи СКАФ (FACS) экспрессии CD69 и CD25 [не показано] на CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Т-клетках.

Фиг. 16: Оценка независимой от мишени активации Т-клеток конструкциями антител против CDH19 HLE ВiTE®. 3 (a) конструкция антитела по изобретению в 48-часовом анализе активации с МКПК (PBMC) человека (3x); HLE Bite® серийные разведения (начиная с 20 нМ; 1:5, 7x плюс холостой); без или с блокировкой FcR [10 мг/мл huIgG (Kiovog, Baxter)]; определение при помощи СКАФ (FACS) экспрессии CD69 и CD25 [не показано] на CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Т-клетках. 3 (b) Конструкция антитела гетеро-Fc в 48-часовом анализе активации с МКПК (PBMC) человека и обедненными CD14<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> клет-

ками МКПК (PBMC) (3x); HLEBite® серийные разведения (начиная с 20 нМ; 1:5, 7x плюс холостой); определение при помощи СКАФ (FACS) экспрессии CD69 и CD25 [не показано] на CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Т-клетках. 3 (с) Конструкция X-тела в 48-часовом анализе активации с МКПК (PBMC) человека и обедненными CD14<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> клетками МКПК (PBMC) (3x); HLEBite® серийные разведения (начиная с 20 нМ; 1:5, 7x плюс холостой); определение при помощи СКАФ (FACS) экспрессии CD69 и CD25 [не показано] на CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Т-клетках.

Фиг. 17: Связывание с комплементом C1q химерных конструкций антител ViTE® Fc. Химерными конструкциями антител ViTE® Fc (ViTE® одноцепочечный Fc (треугольник), ViTE® гетеро Fc (квадраты), канонический ViTE® (круг)) покрывали планшет Maxisorp (в серийных разведениях) перед инкубацией с объединенной в пул сывороткой человека и инкубацией с поликлональным мышинным антителом против CС1q человека, визуализируемым при помощи конъюгатом козьего анти-мышинного Fc-AP.

Фиг. 18: Средние фармакокинетические, ФК (PK) профили для четырех пар химерных белков ViTE®-HLE после однократного введения яванским макакам. Из соображений сопоставимости концентрации в сыворотке были нормализованы на дозу до 15 мкг/кг и указаны в нмоль.

Фиг. 19: Средние ФК (PK) профили для пяти различных конструкций антител ViTE®, каждая из которых слита с фрагментом scFc, увеличивающим период полувыведения. Из соображений сопоставимости концентрации в сыворотке были нормализованы на дозу до 15 мкг/кг и указаны в нмоль.

### Примеры

Следующие примеры иллюстрируют изобретение. Эти примеры не должны толковаться как ограничивающие объем данного изобретения. Данное изобретение ограничивается только формулой изобретения.

Пример 1. Генерация клеток CHO, экспрессирующих МЗЛН (MSLN) дикого типа и химерный

Антиген МЗЛН (MSLN) можно разделить на шесть различных субдоменов или участков, которые определены для целей примеров 1 и 2. Аминокислотная, ак (aa) последовательность этих шести субдоменов представлена в SEQ ID NO: 238-243.

Были получены следующие молекулы; см. также фиг. 1:

hu orl МЗЛН (MSLN)-E1 mu SEQ ID NO: 246

hu orl МЗЛН (MSLN)-E2 mu SEQ ID NO: 247

hu orl МЗЛН (MSLN)-E3 mu SEQ ID NO: 248

hu orl МЗЛН (MSLN)-E4 mu SEQ ID NO: 249

hu orl МЗЛН (MSLN)-E5 mu SEQ ID NO: 250

hu orl МЗЛН (MSLN)-E6 mu SEQ ID NO: 251

hu orl МЗЛН (MSLN)-полноразмерный человеческий SEQ ID NO: 231

Для получения клеток ЯКХ (CHO), экспрессирующих МЗЛН (MSLN) человека, яванского макака ("яванца") и укороченный N-концевой МЗЛН (MSLN) с маркером V5 на N-конце, соответствующие кодирующие последовательности для MSLN (МЗЛН) человека (SEQ ID NO: 231, см. также учетный номер GeneBank NM\_005823), МЗЛН (MSLN) яванского макака (SEQ ID NO: 234, см. LMR C52457) и шесть химерных версий МЗЛН (MSLN) человека/мыши (см. выше) клонируют в плазмиду, обозначенную pEF-DHFR (pEF-DHFR описана в Raum et al., Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). Для экспрессии на клеточной поверхности МЗЛН (MSLN) человека и яванца применяют исходный сигнальный пептид. Все процедуры клонирования выполняют в соответствии со стандартными протоколами (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Для каждой конструкции соответствующую плазмиду трансфектируют в ДГФР (DHFR)-дефицитные клетки ЯКХ (CHO) для эукариотической экспрессии, как описано Kaufman RJ (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566.

Экспрессию МЗЛН (MSLN) человека, химерного и яванца на клетках ЯКХ (CHO) проверяют в анализе СКАФ (FACS) с применением моноклонального мышинного IgG2b антитела против МЗЛН (MSLN) человека. В качестве отрицательного контроля клетки инкубируют с антителом контрольного изотипа вместо первого антитела. Образцы анализируют при помощи проточной цитометрии.

Пример 2. Картирование эпитопов для конструкций антител против МЗЛН (MSLN)

Клетки, трансфектированные МЗЛН (MSLN) человека и химерными молекулами МЗЛН (MSLN) человека (см. Пример 1), окрашивают неочищенным, неразбавленным периплазматическим экстрактом, содержащим конструкции биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КД3 (CD3) (с CD3-связывающим доменом, обозначенным как I2C), слитыми с альбумином человека (вариант 1) в ФСБ (PBS)/1,5% фетальной телячьей сыворотки, ФТС (FCS). Связанные молекулы обнаруживают при помощи мышинного моноклонального антитела против CD3-связывающего домена (50 мкл), а затем при помощи Fc-гамма-ФЭ против мышинного IgG (1:100, 50 мкл, Jackson Immunoresearch № 115-116-071) Все антитела разводят в ФСБ (PBS)/1,5% ФТС (FCS). В качестве отрицательного контроля клетки инкубируют с ФСБ (PBS)/2% ФТС (FCS) вместо периплазматического экстракта. Образцы анализируют методом проточной цитометрии.

Участки, которые были распознаны соответствующими связывающими доменами МЗЛН (MSLN),



приведены в таблице последовательностей (табл. 2). Потеря сигнала FACS в соответствующих химерных конструкциях МЗЛН (MSLN), содержащих кластер мышинового эпитопа, была считана на предмет релевантности соответствующего кластера связыванию. В случае, если на сигнал СКАФ (FACS) отрицательно повлиял более чем один, соответственно два, химерный клон МЗЛН (MSLN), делалось заключение о том, что оба кластера являются релевантными.

Таблица 2. Картирование кластеров эпитопа для MS-1-MS-8

<u>Кластер эпитопа</u>	<u>Связывающий агент</u>
Е 1+2	MS-1
Е 2+3	MS-2
Е 2+3	MS-3
Е 2+3	MS-4
Е 2+3	MS-5
Е 2+3	MS-6
Е 4	MS-7
Е 1+2	MS-8

Пример 3. Анализ аффинности биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3) к МЗЛН (MSLN) человека и макака на целевых антигенположительных клетках и определение межвидового зазора аффинности при помощи Scatchard

Значения аффинности конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3) к клеткам ЯКХ (CHO), трансфектированным МЗЛН (MSLN) человека или макака, также были определены при помощи анализа Scatchard как наиболее надежного метода для определения потенциальных зазоров аффинности между МЗЛН (MSLN) человека и макака. Для анализа Scatchard эксперименты по насыщению связывания выполняют с применением системы одновалентного обнаружения для точного определения одновалентного связывания конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3) с соответствующей клеточной линией.

$2 \times 10^4$  клеток соответствующей клеточной линии (рекомбинантно экспрессирующая МЗЛН (MSLN) человека клеточная линия ЯКХ (CHO), рекомбинантный экспрессирующая МЗЛН (MSLN) макака клеточная линия ЯКХ (CHO)) инкубируют в каждом случае с 50 мкл серий триплетных разведений (двенадцать разведений 1:2) соответствующей конструкции биспецифического антитела против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3) (до достижения насыщения), начиная с 10-20 нМ, с последующей инкубацией в течение 16 часов при 4°C с перемешиванием и одной стадией остаточного промывания. Затем клетки инкубируют в течение еще 1 ч с 30 мкл раствора конъюгата CD3 × ALEXA488. После одностадийного промывания клетки ресуспандируют в 150 мкл буфера СКАФ (FACS), содержащего 3,5% формальдегида, инкубируют еще в течение 15 мин, центрифугируют, ресуспандируют в буфере СКАФ (FACS) и анализируют с применением аппарата СКАФ (FACS) CantoII и программного обеспечения FACS Diva. Данные получены из двух независимых наборов экспериментов, каждый из которых включал три параллельных эксперимента. Проводят вычисления для соответствующего анализа Scatchard с целью экстраполяции максимального связывания ( $B_{max}$ ). Определяют концентрации конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3) при полумаксимальном связывании, которые отражают соответствующие значения КД. Значения измерений в трех параллельных экспериментах нанесены на график в виде гиперболических кривых и в виде S-образных кривых, чтобы продемонстрировать надлежащие диапазоны концентрации от минимального до оптимального связывания.

Значения, приведенные в табл. 3, получены из двух независимых экспериментов на основе конструкции биспецифического антитела против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3). Исследование на клетках с применением Scatchard подтвердило, что значения аффинности конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3) по изобретению к МЗЛН (MSLN) человека и к МЗЛН (MSLN) макака находятся в субнаномолярном диапазоне и представлены с небольшим межвидовым яванца/человека зазором аффинности около 1.

Таблица 3. Значения аффинности (KD) конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3), определенные в исследовании на клетках с применением Scatchard, с вычисленным зазором аффинности KD МЗЛН (MSLN) макака/KD МЗЛН (MSLN) человека. Конструкции антител анализировали в двух независимых экспериментах, каждый из которых проводили в виде трех параллельных экспериментов.

Антитело ViTE против МЗ × T2C-HALB	Аффинность к hu MSLN* в исследовании на клетках [нМ]	Аффинность к mac MSLN* в исследовании на клетках [нМ]	Зазор аффинности KD <sup>mac</sup> /KD <sup>hu</sup> MSLN
MS-1	1,25 ± 0,8	13,86 ± 2,9	11,08
MS-8	4,68 ± 0,4	85,86 ± 16,7	18,35
MS-2	1,40 ± 0,9	10,16 ± 3,5	7,28
MS-3	0,74 ± 0,8	0,82 ± 0,5	1,12
MS-4	0,91 ± 1,0	0,77 ± 0,7	0,85
MS-5	0,39 ± 0,3	2,31 ± 3,7	5,91
MS-6	0,60 ± 0,3	9,03 ± 3,7	15,04
MS-7	1,06 ± 0,5	4,07 ± 1,0	3,86

Пример 4. Биспецифическое связывание и межвидовая перекрестная реактивность

Для подтверждения связывания с МЗЛН (MSLN) и КДЗ (CD3) человека и МЗЛН (MSLN) и КДЗ (CD3) яванца конструкции биспецифического антитела по изобретению тестируют при помощи проточной цитометрии с применением

клеток ЯКХ (CHO), трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека, с изоформой МЗЛН (MSLN) человека (NM\_013404 равно SEQ ID NO: 232 и AY743922 равно SEQ ID NO: 233) и с МЗЛН (MSLN) макака соответственно,

МЗЛН (MSLN) человека-положительной клеточной линии человека OVCAR-8,

экспрессирующей КДЗ (CD3) клеточной линии Т-клеточного лейкоза человека HPB-all (DSMZ, Braunschweig, ACC483) и

экспрессирующей КДЗ (CD3) яванского макака Т-клеточной линии LnPx 4119.

Для проточной цитометрии 200000 клеток соответствующих клеточных линий инкубируют в течение 60 мин при 4°C с 50 мкл очищенной конструкции биспецифического антитела в концентрации 5 мкг/мл. Клетки дважды промывают ФСБ (PBS)/2% ФТС (FCS) и затем инкубируют с самостоятельно полученным мышинным антителом (2 мкг/мл), специфическим в отношении КДЗ (CD3)-связывающей части конструкций биспецифических антител, в течение 30 мин при 4°C. После промывания связанные мышинные антитела обнаруживают при помощи козьего антимышинного Fcy-ФЭ (1:100) в течение 30 мин при 4°C. Образцы анализируют при помощи проточной цитометрии. В качестве отрицательного контроля применяют нетрансфектированные клетки ЯКХ (CHO).

Результаты проиллюстрированы на фиг. 2 и 3. Конструкции биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3) по изобретению окрашивают клетки ЯКХ (CHO), трансфектированные МЗЛН (MSLN) человека, искусственной изоформой МЗЛН (MSLN) и МЗЛН (MSLN) яванца, а также окрашивают МЗЛН (MSLN) человека-положительную клеточную линию человека OVCAR-8 (в которой присутствует естественная экспрессия). Кроме того, экспрессирующие КДЗ (CD3) линии Т-клеток были распознаны конструкциями биспецифических антител. Дополнительно, не наблюдалось окрашивания клеток отрицательного контроля (нетрансфектированных ЯКХ (CHO)).

Пример 5. Цитотоксическая активность

Активность конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3) по изобретению с точки зрения перенацеливания эффекторных Т-клеток против экспрессирующих МЗЛН (MSLN) клеток-мишеней анализировали в пяти анализах цитотоксичности *in vitro*:

Активность конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3) с точки зрения перенацеливания стимулированных CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток человека против трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO) была измерена в 18-часовом анализе высвобождения <sup>51</sup>Cr. (Соотношение эффектор:мишень 10:1). (Фиг. 4 и табл. 4).

Активность конструкций биспецифических антител МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3) с точки зрения перенацеливания стимулированных CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток человека против МЗЛН (MSLN)-положительной клеточной линии OVCAR-8 была измерена в 18-часовом анализе высвобождения <sup>51</sup>Cr. (Соотношение эффектор:мишень 10:1). Фиг. 5 и табл. 5.

Эффективность конструкций биспецифических антител МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3) с точки зрения перенацеливания Т-клеток в нестимулированных МКПК (PBMC) человека (CD14/CD56<sup>+</sup>) против трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO) в отсутствие и в присутствии растворимого МЗЛН (MSLN) измеряли в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе СКАФ (FACS). (Соотношение

эффектор:мишень 10:1) (Фиг. 6 и табл. 6).

Эффективность конструкций биспецифических антител МЗЛН (MSLN) x КД3 (CD3) с точки зрения перенацеливания Т-клеток в нестимулированных МКПК (PBMC) человека (CD14/CD56<sup>+</sup>) против МЗЛН (MSLN)-положительной клеточной линии человека OVCAR-8 измеряли в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе СКАФ (FACS) (Фиг. 7).

Для подтверждения того, что конструкции биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КД3 (CD3) с перекрестной реактивностью способны перенацеливать Т-клетки макака против трансфектированных МЗЛН (MSLN) макака клеток ЯКХ (CHO), проводили 48-часовой анализ цитотоксичности на основе СКАФ (FACS) с применением линии Т-клеток макака LpP<sub>x</sub>4119 в качестве эффекторных Т-клеток (Соотношение эффектор:мишень 10:1) (Фиг. 8).

Зазор активности перенацеливания Т-клеток в стимулированных CD8<sup>+</sup> человека эффекторных Т-клетках против трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO) между мономерной и димерной изоформами конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КД3 (CD3) был измерен в 18-часовом анализе высвобождения <sup>51</sup>Cr (Соотношение эффектор:мишень 10:1) (Фиг. 9).

Пример 5.1. Анализ высвобождения хрома с применением стимулированных Т-клеток человека

Стимулированные Т-клетки, обогащенные CD8<sup>+</sup> Т-клетками, получают, как описано ниже. Чашку Петри (диаметр 145 мм, Greiner bio-one GmbH, Кремсшунстер) покрывают коммерчески доступным анти-CD3-специфическим антителом (ОКТ3, Orthoclone) в конечной концентрации 1 мкг/мл в течение 1 ч при 37°C. Несвязанный белок удаляют одностадийным промыванием ФСБ (PBS). 3-5×10<sup>7</sup> МКПК (PBMC) человека помещают на предварительно покрытую чашку Петри в 120 мл RPMI 1640 со стабилизированным глутамином/10% ФТС (FCS)/IL-220 Ед/мл (Proleukin®, Chiron) и стимулируют в течение 2 дней. На третий день клетки собирают и промывают один раз RPMI 1640. IL-2 добавляют до конечной концентрации 20 Ед/мл, и клетки снова культивируют в течение одного дня в той же среде для культивирования клеток, что указана выше. CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ (CTL)) обогащают путем истощения CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD56<sup>+</sup> ПК (NK)-клеток с применением Dynal-Beads в соответствии с протоколом производителя.

Трансфектированные МЗЛН (MSLN) яванца или МЗЛН (MSLN) человека клетки-мишени ЯКХ (CHO) дважды промывают ФСБ (PBS) и маркируют 11,1 МБк <sup>51</sup>Cr в конечном объеме 100 мкл RPMI с 50% ФТС (FCS) в течение 60 мин при 37°C. После этого меченые клетки-мишени промывают 3 раза по 5 мл RPMI и затем используют в анализе цитотоксичности. Анализ проводят на 96-луночной планшете в общем объеме 200 мкл RPMI с добавками, с соотношением Э:М (Э:М) 10:1. Применяют начальную концентрацию 0,01-1 мкг/мл очищенной конструкции биспецифического антитела и трехкратные разведения. Время инкубации для анализа составляет 18 ч. Цитотоксичность определяют как относительные значения высвобожденного хрома в супернатанте относительно разности максимального лизиса (добавление Тритона-X) и спонтанного лизиса (без эффекторных клеток). Все измерения проводят в 4 параллельных экспериментах. Активность хрома в супернатантах измеряют на гамма-счетчике Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Кельн, Германия). Анализ результатов выполняют при помощи Prism 5 для Windows (версия 5.0, GraphPad Software Inc., Сан-Диего, штат Калифорния, США). Значения EC<sub>50</sub>, вычисленные программой анализа на основе сигмоидальных кривых дозы-реакции, используют для сравнения цитотоксической активности.

Пример 5.2. Эффективность перенацеливания стимулированных эффекторных Т-клеток человека против трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO)

Цитотоксическую активность конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КД3 (CD3) в соответствии с изобретением изучали в анализе цитотоксичности с высвобождением хрома-51 (<sup>51</sup>Cr) с применением трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO) в качестве клеток-мишеней и стимулированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток человека в качестве эффекторных клеток. Эксперимент проводили, как описано в примере 8.1.

Результаты приведены в табл. 4. Конструкции биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) x КД3 (CD3) продемонстрировали очень высокую цитотоксическую активность против трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO) в диапазоне однозначных пикомолярных значений.

Таблица 4. Значения  $EC_{50}$  [пМ] конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3), изученных в анализе цитотоксичности с высвобождением хрома-51 ( $^{51}Cr$ ) с применением трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO) в качестве клеток-мишеней и стимулированных CD8 Т-клеток человека в качестве эффекторных клеток

BiTE × I2C-HALB	$EC_{50}$ [пМ]
MS 1	1,5
MS 8	6,5
MS 2	2,0
MS 3	0,2
MS 4	0,1
MS 5	0,2
MS 6	0,5
MS 7	6,0

Пример 5.3. Активность перенацеливания стимулированных эффекторных Т-клеток человека против МЗЛН (MSLN)-положительной клеточной линии человека OVCAR-8

Цитотоксическую активность конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3) изучали в анализе цитотоксичности с высвобождением хрома-51 ( $^{51}Cr$ ) с применением МЗЛН (MSLN) - положительной клеточной линии человека OVCAR-8 в качестве источника клеток-мишеней и стимулированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток человека в качестве эффекторных клеток. Анализ проводили, как описано в примере 8.1.

В соответствии с результатами исследований высвобождения хрома-51 с применением стимулированных обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов человека в качестве эффекторных клеток и трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO) в качестве клеток-мишеней, конструкции биспецифических антител против DLB3 × КДЗ (CD3) по данному изобретению также оказывают выраженное влияние на цитотоксическую активность против клеток-мишеней с естественной экспрессией (см. табл. 5).

Таблица 5. Значения  $EC_{50}$  [пМ] конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3) определяли в 18-часовом анализе цитотоксичности с высвобождением хрома-51 ( $^{51}Cr$ ) с применением МЗЛН (MSLN)-положительной клеточной линии человека OVCAR-8 в качестве источника клеток-мишеней и стимулированных обогащенных CD8 Т-клеток человека в качестве эффекторных клеток.

BiTE × I2C-HALB	$EC_{50}$ [пМ]
MS 1	0,2
MS 8	1,3
MS 2	0,8
MS 3	0,1
MS 4	0,1
MS 5	0,3
MS 6	0,2
MS 7	0,5

Пример 5.4. Анализ цитотоксичности на основе СКАФ (FACS) с применением нестимулированных МКПК (PBMC) человека

#### Выделение эффекторных клеток

Мононуклеарные клетки периферической крови человека МКПК (PBMC) получают центрифугированием с градиентом плотности Ficoll из обогащенных лимфоцитами препаратов (лейкоцитарные пленки), побочного продукта банков крови, собирающих кровь для переливания. Лейкоцитарные пленки поставлялись местным банком крови, и МКПК (PBMC) получали в день сбора крови. После центрифугирования с градиентом плотности Ficoll и тщательного промывания ФСБ (PBS) Dulbecco (Gibco) оставшиеся эритроциты удаляют из МКПК (PBMC) путем инкубации с буфером для лизиса эритроцитов (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 100 мкМ ЭДТА). Тромбоциты удаляют с супернатантом при центрифугировании МКПК (PBMC) при 100 × g. Оставшиеся лимфоциты в основном включают В- и Т-лимфоциты, ПК (NK)-клетки и моноциты. МКПК (PBMC) содержат в культуре при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в среде RPMI (Gibco) с 10% ФТС (FCS) (Gibco).

#### Истощение CD14<sup>+</sup> и CD56<sup>+</sup> клеток

Для истощения CD14<sup>+</sup> клеток применяют микрошарики MicroBeads CD14 человека (Milteny Biotec, MACS, № 130-050-201), для истощения ПК (NK)-клеток - микрошарики MicroBeads CD56 человека (MACS, № 130-050-401). МКПК (PBMC) подсчитывают и центрифугируют в течение 10 мин при комнатной температуре и 300 × g. Супернатант отбрасывают, а осадок клеток ресуспендируют в буфере для выделения MACS [80 мкл/10<sup>7</sup> клеток; ФСБ (PBS) (Invitrogen, № 20012-043), 0,5% (об./об.) ФСБ (FBS)

(Gibco, № 10270-106), 2 mM ЭДТА (Sigma-Aldrich, № E-6511)]. Добавляют MicroBeads CD14 и MicroBeads CD56 (20 мкл/10<sup>7</sup> клеток) и инкубируют в течение 15 мин при 4-8°C. Клетки промывают буфером для выделения MACS (1-2 мл/10<sup>7</sup> клеток). После центрифугирования (см. выше) супернатант отбрасывают и клетки ресуспендируют в буфере для выделения MACS (500 мкл/10<sup>8</sup> клеток). Затем CD14/CD56 отрицательные клетки выделяют с применением колонок LS (Miltenyi Biotec, № 130-042-401). МКПК (PBMC) без клеток CD14<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> культивируют в полной среде RPMI, т.е., RPMI1640 (Biochrom AG, № FG1215), содержащей 10% ФТС (FBS) (Biochrom AG, № S0115), 1х незаменимых аминокислот (Biochrom AG, № K0293), 10 mM (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (буфер ГЭПЭС (Hepes)) (Biochrom AG, № L1613), 1 mM пирувата натрия (Biochrom AG, № L0473) и 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина (Biochrom AG, № A2213) при 37°C в инкубаторе до использования.

#### Маркировка целевых клеток

С целью анализа лизиса клеток методом проточной цитометрии применяют флуоресцентный мембранный краситель DiOC<sub>18</sub> (DiO) (Molecular Probes, № V22886), чтобы маркировать трансфектированные МЗЛН (MSLN) человека или МЗЛН (MSLN) макака клетки ЯКХ (CHO) в качестве клеток-мишеней и отличить их от эффекторных клеток. Вкратце, клетки собирают, один раз промывают ФСБ (PBS) и их количество доводят до 10<sup>6</sup> клеток/мл ФСБ (PBS), содержащим 2% (об./об.) ФТС (FBS) и мембранный краситель DiO (5 мкл/10<sup>6</sup> клеток). После инкубации в течение 3 мин при 37°C клетки дважды промывают полной средой RPMI, и количество клеток доводят до 1,2×10<sup>5</sup> клеток/мл. Жизнеспособность клеток определяют с применением 0,5% (об./об.) изотонического раствора Эозина G (Roth, № 45380).

#### Анализ на основе проточной цитометрии

Этот анализ разработан для количественной оценки лизиса клеток ЯКХ (CHO), трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека или ямайца, в присутствии серийных разведений конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN). Равные объемы меченых DiO клеток-мишеней и эффекторных клеток (т.е., МКПК (PBMC) без клеток CD14<sup>+</sup>) смешивают, в результате чего соотношение клеток Э:М составляет 10:1. 160 мкл этой суспензии переносят в каждую лунку 96-луночного планшета. Добавляют 40 мкл серийных разведений конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КД3 (CD3) и добавляют отрицательную контрольную биспецифическую (конструкция биспецифического антитела на основе КД3 (CD3), распознающая нерелевантный целевой антиген) или полную среду RPMI в качестве дополнительного отрицательного контроля. Опосредованная биспецифическим антителом цитотоксическая реакция протекает в течение 48 ч в увлажненном инкубаторе, содержащем 7% CO<sub>2</sub>. Затем клетки переносят на новый 96-луночный планшет и осуществляют проверку целостности клеточной мембраны мишени путем добавления пропидия йодида, ПЙ (PI) в конечной концентрации 1 мкг/мл. ПЙ (PI) представляет собой не проникающий сквозь мембрану краситель, который обычно исключается из жизнеспособных клеток, тогда как мертвые клетки захватывают его и становятся различимыми благодаря флуоресцентной эмиссии.

Измерение образцов проводят проточной цитометрией на приборе СКАФ (FACS) Canto II и анализируют при помощи программного обеспечения FACSDiva (оба производства Becton Dickinson). Клетки-мишени идентифицируют как DiO-положительные клетки. ПЙ (PI)-отрицательные клетки-мишени классифицируют как живые клетки-мишени. Процент цитотоксичности вычисляют по следующей формуле:

$$\text{Цитотоксичность [\%]} = \frac{n_{\text{мертвые клетки-мишени}}}{n_{\text{клетки-мишени}}} \times 100$$

где n=количество событий.

С применением программного обеспечения GraphPad Prism 5 (программное обеспечение GraphPad Software, Сан-Диего), на график наносят зависимость процента цитотоксичности от соответствующих концентраций конструкции биспецифического антитела. Кривые зависимости дозы-реакции анализируют при помощи моделей четырехпараметрической логистической регрессии для оценки сигмовидных кривых зависимости дозы-реакции с фиксированным угловым коэффициентом Хилла и вычисляют значения EC<sub>50</sub>.

Пример 5.5. Потенциал перенацеливания нестимулированных МКПК (PBMC) человека против трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO) в отсутствие или в присутствии растворимого МЗЛН (MSLN)

Цитотоксическую активность конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КД3 (CD3) изучали в анализе цитотоксичности на основе СКАФ (FACS) с применением трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO) в качестве клеток-мишеней и нестимулированных МКПК (PBMC) человека в качестве эффекторных клеток. Анализ проводили, как описано в примере 8.4 выше.

Результаты анализов цитотоксичности на основе СКАФ (FACS) с нестимулированными МКПК (PBMC) человека в качестве эффекторных клеток и трансфектированными МЗЛН (MSLN) человека клетками ЯКХ (CHO) в качестве мишеней приведены в табл. 7.

Таблица 6. Цитотоксическая активность нестимулированных МКПК (PBMC) человека против трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO) в отсутствие и в присутствии растворимого МЗЛН (MSLN)

	Без sMSLN	С 50 нг/мл sMSLN	С 400 нг/мл sMSLN
BiTE × I2C-HALB	EC50 [пМ]	EC50 [пМ]	EC50 [пМ]
MS-1	12	53	215
MS-8	3,4	8,3	39
MS-2	2,4	2,9	6,3
MS-3	1,2	3,0	16
MS-4	1,5	3,9	11
MS-5	1,0	2,2	11
MS-6	1,1	2,6	12
MS-7	8,1	28	166

Как и ожидалось, значения EC<sub>50</sub> в целом были выше в анализах цитотоксичности с нестимулированными МКПК (PBMC) в качестве эффекторных клеток по сравнению с анализами цитотоксичности с применением стимулированных CD8+ Т-клеток человека (см. Пример 8.2).

Пример 5.6. Активность перенацеливания нестимулированных МКПК (PBMC) человека против МЗЛН (MSLN)-положительной клеточной линии клеток OVCAR-8

Дополнительно, цитотоксическую активность конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КД3 (CD3) изучали в анализе цитотоксичности на основе СКАФ (FACS) с применением МЗЛН (MSLN)-положительной клеточной линии человека OVCAR-8 в качестве источника клеток-мишеней и нестимулированных МКПК (PBMC) человека в качестве эффекторных клеток. Анализ проводили, как описано в примере 8.4 выше. Результаты приведены в табл. 7.

Таблица 7. Значения EC<sub>50</sub> [пМ] конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КД3 (CD3), определенные в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе СКАФ (FACS) с нестимулированными МКПК (PBMC) человека в качестве эффекторных клеток и клеточной линии OVCAR-8 человека в качестве источника клеток-мишеней

BiTE × I2C-HALB	EC50 [пМ]
MS 1	5,9
MS 8	13
MS 2	18
MS 3	1,5
MS 4	2,0
MS 5	1,9
MS 6	2,3
MS 7	9,7

Пример 5.7. Активность перенацеливания Т-клеток макака против экспрессирующих МЗЛН (MSLN) макака клеток ЯКХ (CHO)

Цитотоксическую активность конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КД3 (CD3) изучали в анализе цитотоксичности на основе СКАФ (FACS) с применением клеток ЯКХ (CHO), трансфектированных МЗЛН (MSLN) макака (яванца), в качестве клеток-мишеней, и линии Т-клеток макака 4119LnPx (Knappe et al., Blood 95: 3256-61 (2000)) в качестве источника эффекторных клеток. Маркировку клеток-мишеней для трансфектированных МЗЛН (MSLN) макака клеток ЯКХ (CHO) и анализ цитотоксической активности на основе проточной цитометрии проводили, как описано выше.

Результаты приведены в табл. 8. Т-клетки макака из клеточной линии 4119LnPx были индуцированы для эффективного уничтожения трансфектированных МЗЛН (MSLN) макака клеток ЯКХ (CHO) конструкциями биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КД3 (CD3) по изобретению.

Таблица 8. Значения EC<sub>50</sub> [пМ] конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КД3 (CD3), определенные в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе СКАФ (FACS) с линией Т-клеток макака 4119LnPx в качестве эффекторных клеток и трансфектированными МЗЛН (MSLN) макака клетками ЯКХ (CHO) в качестве клеток-мишеней

BiTE × I2C-HALB	EC50 [пМ]
MS 1	434
MS 8	1589
MS 2	583

MS 3	56
MS 4	67
MS 5	85
MS 6	100
MS 7	1791

Пример 5.8. Зазор активности между мономерной и димерной изоформой конструкций биспецифических антител

С целью определения разницы в цитотоксической активности между мономерной и димерной изоформой отдельных конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3) (которая называется зазором активности), проводили 18-часовое исследование цитотоксичности с высвобождением хрома-51, как описано выше (пример 8.1) с мономером и димером очищенного биспецифического антитела. Эффекторными клетками представляют собой стимулированные обогащенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки человека. Клетки-мишени представляют собой трансфектированные hu МЗЛН (MSLN) клетки ЯКХ (CHO). Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (Э:М) составляет 10:1. Зазор активности вычисляют как соотношение между значениями EC<sub>50</sub>.

Результаты анализов, проведенных со стимулированными обогащенными CD<sup>+</sup> Т-клетками человека в роли эффекторных клеток и трансфектированными МЗЛН (MSLN) человека клетками ЯКХ (CHO) в качестве мишеней приведены в табл. 9.

Таблица 9. Цитотоксическая активность нестимулированных МКПК (PBMC) человека против трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO) с применением мономерных и димерных конструкций биспецифических антител МЗЛН (MSLN) × КДЗ (CD3)

BiTE × I2C-HALB	EC <sub>50</sub> [пМ]		Соотношение мономера к димеру (EC <sub>50</sub> мономера / EC <sub>50</sub> димера)
	мономер	димер	
MS 1	1,5	1,7	0,9
MS 8	6,5	9,5	0,7
MS 2	2,0	2,0	1,0
MS 3	0,2	0,7	0,3
MS 4	0,1	0,9	0,1
MS 5	0,2	1,1	0,2
MS 6	0,5	3,4	0,1
MS 7	6,0	21	0,3

Пример 6. Стабильность после инкубации в плазме человека в течение 24 ч

Очищенные конструкции биспецифических антител инкубируют в соотношении 1:5 в пуле плазмы человека при 37°C в течение 96 ч при конечной концентрации 2-20 мкг/мл. После инкубации в плазме конструкции антител сравнивают в анализе высвобождения хрома-51 с применением стимулированных обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток человека и трансфектированных МЗЛН (MSLN) человека клеток ЯКХ (CHO) при начальной концентрации 0,01-0,1 мкг/мл с соотношением эффекторных клеток и клеток-мишеней (Э:М) 10:1 (анализ проводят, как описано в примере 8.1). В качестве контроля включают неинкубированные, недавно размороженные конструкции биспецифических антител.

Результаты приведены в табл. 10 ниже. Все протестированные конструкции антител продемонстрировали в высокой степени благоприятную стабильность в плазме (EC<sub>50</sub> плазма/EC<sub>50</sub> контроль) меньше или равно 4.

Таблица 10. Значения EC<sub>50</sub> конструкций антител с инкубацией в плазме и без нее и вычисленное значение соотношения плазмы/контроля

BiTE × I2C-HALB	EC <sub>50</sub> [пМ]		Соотношение плазмы к контролю (EC <sub>50</sub> плазма / EC <sub>50</sub> контроль)
	с плазмой без плазмы		
MS 1	3,0	1,5	2,0
MS 8	4,8	6,5	0,7
MS 2	6,7	2,0	3,4
MS 3	0,3	0,2	1,5
MS 4	0,4	0,1	4
MS 5	0,3	0,2	1,5
MS 6	0,6	0,5	1,2
MS 7	11,4	6,0	1,9

Пример 7. Гомогенность белка по данным высокоэффективной катионообменной хроматографии  
Гомогенность белка для конструкций антител по изобретению анализируют при помощи высоко-

эффективной катионообменной хроматографии, КОХ (СІЕХ).

50 мкг мономера конструкции антитела разбавляют 50 мл буфера связывания А (20 мМ дигидрофосфата натрия, 30 мМ NaCl, 0,01% октаната натрия, pH 5,5) и 40 мл полученного раствора наносят на колонку BioPro SP-F 1 мл (УМС, Германия), подключенную к устройству Äkta Micro FPLC (GE Healthcare, Германия). После связывания образца проводят стадию промывания дополнительным количеством буфера связывания. Для элюации белка применяют линейный понижающий градиент соли с применением буфера В (20 мМ дигидрофосфата натрия, 1000 мМ NaCl, 0,01% октаната натрия, pH 5,5) до 50% буфера В в течение 10 объемов колонки. Весь прогон контролируют по оптической плотности на длине волны 280, 254 и 210 нм. Анализ проводят путем интеграции пиков сигнала на длине волны 280 нм, зарегистрированных на оценочном листе прогона программным обеспечением Äkta Unicorn.

Результаты приведены в табл. 11 ниже. Почти все протестированные конструкции антител продемонстрировали в высокой степени благоприятную гомогенность больше или равно 80% (площадь под кривой (= AUC) основного пика). Единственным исключением является биспецифическая конструкция MS-2хCD3-HALB, с гомогенностью всего 67%.

Таблица 11. Гомогенность белка для конструкций антител (% AUC основного пика)

MSLN HALB BiTE	AUC основного пика [%]
MS 1	100
MS 8	93
MS 2	67
MS 3	87
MS 4	80
MS 5	89
MS 6	81
MS 7	100

Пример 8. Гидрофобность поверхности, измеренная методом ХГВ (НІС)

Бутил

Гидрофобность поверхности конструкций биспецифических антител по изобретению тестировали методом хроматографии с гидрофобным взаимодействием, ХГВ (НІС) в проточном режиме.

50 мкг мономера конструкции антитела разбавляют генерическим буфером препарата до конечного объема 500 мкл (10 мМ лимонной кислоты, 75 мМ лизина HCl, 4% трегалозы, pH 7,0) и наносят на колонку с бутилсефарозой FF 1 мл (GE Healthcare, Германия), подключенную к системе FPLC Äkta Purifier (GE Healthcare, Германия). Весь прогон контролируют по оптической плотности на длине волны 280, 254 и 210 нм. Анализ проводят путем интеграции пиков сигнала на длине волны 280 нм, зарегистрированных на оценочном листе прогона программным обеспечением Äkta Unicorn. Поведение при элюации оценивают путем сравнения площади и скорости нарастания и снижения сигнала белка, что указывает на прочность взаимодействия химеры BiTE альбумина с матрицей.

Конструкции антител демонстрировали благоприятное поведение при элюации, которая в основном была быстрой и полной (см. табл. 12).

Таблица 12. Гидрофобность поверхности конструкций биспецифических антител

MSLN HALB BiTE	Поведение при элюации ХГВ Бутил
MS 1	1
MS 8	1
MS 2	1
MS 3	1
MS 4	1
MS 5	1
MS 6	1
MS 7	1

Пример 9. Превращение мономера в димер после (i) трех циклов замораживания/оттаивания и (ii) 7 дней инкубации в концентрации 250 мкг/мл

Мономерную конструкцию биспецифического антитела против МЗЛН (MSLN) × КД3 (CD3) подвергали воздействию различных стрессовых условий, с последующим анализом методом высокоэффективной ЭХ (SEC), чтобы определить процент первоначально мономерной конструкции антитела, которая превратилась в димерную конструкцию антитела.

(i) 25 мкг мономерной конструкции антитела доводят до концентрации 250 мкг/мл при помощи генерического буфера препарата, после чего замораживают при минус 80°C в течение 30 мин с последующим оттаиванием в течение 30 мин при комнатной температуре. После трех циклов замораживания/оттаивания содержание димера определяют методом ВЭ-ЭХ (HP-SEC).



(ii) 25 мкг мономерной конструкции антитела доводят до концентрации 250 мкг/мл при помощи генерического буфера препарата, после чего инкубируют при 37°C в течение 7 дней. Содержание димера определяют методом ВЭ-ЭХ (HP-SEC).

Высокоэффективную колонку для ЭХ (SEC) TSK Gel G3000 SWXL (Tosoh, Токио, Япония) подключают к Äkta Purifier 10 FPLC (GE Lifesciences), оснащенной автосемплером A905. Колонку уравнивают, а буфер анализа состоит из 100 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -200 мМ  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , с коррекцией pH до 6,6. Раствор антитела (25 мкг белка) наносят на уравновешенную колонку и осуществляют элюацию со скоростью потока 0,75 мл/мин при максимальном давлении 7 МПа. Весь прогон контролируют по оптической плотности на длине волны 280, 254 и 210 нм. Анализ проводят путем интеграции пиков сигнала на длине волны 210 нм, зарегистрированных на оценочном листе прогона программным обеспечением Äkta Unicorn. Содержание димера вычисляют путем деления площади пика димера на общую площадь пика мономера плюс димера.

Результаты приведены в табл. 13 ниже. Конструкции биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КД3 (CD3) по изобретению представлены с процентным содержанием димера 0,0% после трех циклов замораживания/оттаивания и с содержанием димера меньше или равно 2% после 7 дней инкубации при 37°C.

Таблица 13. Процент мономерных и димерных конструкций биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КД3 (CD3), определенный методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии, ВЭ-ЭХ (HP-SEC).

MSLN HALB BiTE	Превращение BiTE в димер [%]
MS 1	0,2
MS 8	1,6
MS 2	0,0
MS 3	1,7
MS 4	0,3
MS 5	1,2
MS 6	0,4
MS 7	2,2

#### Пример 10. Термостабильность

Температуру агрегации антитела определяют следующим образом: 40 мкл раствора конструкции антитела с концентрацией 250 мкг/мл переносят в одноразовую кювету и помещают в устройство динамического рассеяния света Wyatt DynaPro Nanostar (Wyatt). Образец нагревают от 40 до 70°C со скоростью нагрева 0,5°C/мин с постоянным получением измеренного радиуса. Увеличение радиуса, указывающее на плавление белка и агрегацию, используется программным пакетом, поставляемым с устройством ДРС (DLS), для вычисления температуры агрегации конструкции антитела.

Все протестированные конструкции биспецифических антител против МЗЛН (MSLN) × КД3 (CD3) по изобретению демонстрируют термическую стабильность с температурами агрегации больше или равно 49°C, как показано в табл. 14 ниже. Термическая стабильность группы конструкций антител, связывающихся с кластером эпитопа 2 плюс 3 даже составляет больше или равно 51°C и до больше или равно 56°C.

Таблица 14. Термостабильность конструкций биспецифических антител, определенная при помощи ДРС (DLS) (динамическое рассеяние света)

MSLN HALB BiTE	Термостабильность ДРС $T_A$ [°C]
MS 1	49,3
MS 8	51,0
MS 2	53,1
MS 3	51,6
MS 4	56,5
MS 5	54,4
MS 6	53,9
MS 7	51,4

#### Пример 11. Мутность при концентрации антитела 2500 мкг/мл

1 мл раствора очищенной конструкции антитела в концентрации 250 мкг/мл концентрируют при помощи модулей спин-концентрации до 2500 мкг/мл. После 16-часового хранения при 5°C мутность раствора антитела определяют по оптической плотности OD340 нм, проводя измерения против генерического буфера препарата.

Результаты приведены в табл. 15 ниже. Все тестируемые конструкции антител демонстрируют в

высокой степени благоприятную мутность меньше или равно 0,09.

Таблица 15. Мутность конструкций антител после концентрирования до 2,5 мг/мл в течение ночи

MSLN HALB BiTE	Мутность через 16 час при 2500 мкг/мл [OD340]
MS 1	0,080
MS 8	0,079
MS 2	0,070
MS 3	0,087
MS 4	0,076
MS 5	0,071
MS 6	0,070
MS 7	0,066

Пример 12. Экспрессия CD69, индуцированная BiTE® на Т-клетках в отсутствие клеток-мишеней

Выделенные МКПК (PBMC) здоровых людей-доноров культивировали с увеличивающимися концентрациями CDH19/CD3 или MSLN/CD3 HLE биспецифических антител в течение 48 ч. Экспрессию активационного маркера CD69 на Т-клетках определяли путем иммуноокрашивания и проточной цитометрии и антигенспецифических конъюгатов mAb.

Независимая от мишени активация Т-клеток в показателях активации CD69 наблюдалась для всех конструкций анти-CDH 19, но была наиболее выражена для молекул гетеро-Fc и кросс-тел. Активация CD69 анти-CDH19-scFc происходила при более высоких концентрациях, и амплитуда была частично ниже по сравнению с двумя другими конструкциями на основе Fc.

В случае анти-МЗЛН (MSLN) почти не наблюдалось независимой от мишени активации Т-клеток для scFc-содержащей молекулы, в то время как конструкция гетеро-Fc индуцировала выраженную активацию CD69 на клеточной поверхности Т-клеток в отсутствие клеток-мишеней.

Оценку независимой от мишени активации Т-клеток, индуцированной конструкциями BiTE®, содержащими одноцепочечный Fc или слияние гетеро-Fc на С-конце, проводили для следующих конструкций:

Конструкции BiTE® (серийные разведения: 0,1 пМ - 2 мкМ)

а) MSLN scFc; 1,14 мг/мл;

б) MSLN гетеро-Fc; 1,02 мг/

Эффекторные клетки МКПК (PBMC) человека (3 донора, № 065, № 823, № 836 (scFc) № 401, № 415, № 433 (гетеро-Fc), № 590, № 595, 598, № 605 (Х-тело)).

Время инкубации 48 ч.

Определение экспрессии CD69 на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках при помощи проточного цитометра и антигенспецифических конъюгатов mAb. Результаты представлены на фиг. 15.

Проведена оценка независимой от мишени активации Т-клеток, индуцированной конструкциями антител BiTE®, содержащими одноцепочечное Fc, слияние гетеро-Fc или кросс-тело на С-конце, для следующих конструкций:

Конструкции BiTE® (серийные разведения: 0,1 пМ - 2 мкМ)

с) CDH19 scFc; 245,3 мкг/мл

д) CDH-19 гетеро-Fc; 1 мг/мл

е) CDH19 Х-тело; 6,3 мг/мл

Эффекторные клетки МКПК (PBMC) человека (от 3 до 4 доноров, № 386, № 392, № 401 (scFc) № 282, № 284, № 287 (гетеро-Fc)).

Время инкубации 48 ч.

Определение экспрессии CD69 на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках при помощи проточного цитометра и антигенспецифических конъюгатов mAb. Результаты представлены на фиг. 16.

Пример 13.

Очищенными конструкциями антител BiTE® покрывают планшет Maxisorb с понижающейся концентрацией (растворы 100 нм, разведение 1:4). После 3х промывания ФСБ-Т (PBS-Т) и блокирования ФСБ (PBS)/3% (мас./об) альбумина телячьей сыворотки, АТС (BSA) (60 мин, 37°C) объединенную в пул плазму человека инкубируют в течение 60 мин при 80 об/мин и комнатной температуре. После 3х промывания добавляют мышинное моноклональное антитело, специфическое в отношении субъединицы А С1q человека (CC1q) (Thermo MA1-83963, 1:500) на 60 мин, 80 об/мин, комнатная температура и после описанных стадий промывания инкубируют с козьим антимышиным Fc-POX mAb (1:5000) в течение 60 мин, 80 об/мин, при комнатной температуре. После дополнительного промывания инкубируют с субстратом ТМБ (ТМБ, 3,3',5,5'-тетраметилбензидином) и после протекания колориметрической реакции останавливают добавлением H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Определяют поглощение при 450 нм.

Результат: Как представлено на фиг. 17 при высоких концентрациях, конструкция BiTE® гетеро-Fc (квадраты) продемонстрировала более высокие сигналы связывания для СС1q человека по сравнению с конструкцией одноцепочечного Fc (треугольник) BiTE®. В качестве отрицательного контроля применяют канонической Bite® (круг), который не продемонстрировал значительного связывания с СС1q.

Пример 14. Фармакокинетика конструкций антител ViTE®, слитых с одноцепочечными Fc (scFc) и гетеро-Fc (hetFc) белками

Осуществляют слияние различных антител ViTE®, связывающихся с мишенью, с двумя разными фрагментами, увеличивающими период полувыведения. Два различных HLE-варианта на антитело Bite®, впоследствии названные Bite®-scFc и Bite®-hetFc, были испытаны на яванских макаках в контексте фармакокинетических, ФК (ПК) исследований. Соответствующая номенклатура указанных молекул кратко суммирована в табл. 16 ниже.

Таблица 16. Номенклатура соединений для девяти однократно вводимых конструкций антител Bite® HLE

Синоним соединения	Название испытуемого соединения
Соединение 1a	CD33cc-scFc
Соединение 1b	CD33cc-hetFc
Соединение 2a	MSLN-scFc
Соединение 2b	MSLN-hetFc
Соединение 3a	CDH19-scFc
Соединение 3b	CH19-hetFc
Соединение 4	CD20-scFc
Соединение 5a	DLL3-scFc
Соединение 5b	DLL3-hetFc

Конструкцию антитела ViTE® HLE вводят в виде внутривенного болюса (соединения 1b-5b) и внутривенной инфузии (соединение 1a, 30 минут) в дозе 6 мкг/кг (соединение 2b), 12 мкг/кг (соединения 2a и 3a-5b) и 15 мкг/кг (соединения 1a и 1b) соответственно. Для каждого из вышеуказанных соединений используют группу по меньшей мере от двух до трех животных. Отбирают образцы крови и готовят сыворотку для определения концентрации в сыворотке. Уровни конструкций антител в сыворотке Bite® измеряют при помощи иммуноанализа. Анализ проводят путем захвата ViTE® через его фрагмент-мишень, тогда как для обнаружения применяется антитело, нацеленное против КДЗ (CD3) - связывающей части конструкции. Профили концентрации в сыворотке-времени используют для определения параметров ФК (ПК). Временные точки отбора образцов крови приведены в табл. 17 ниже.

Таблица 17. Временные точки отбора образцов крови во время исследования ФК (ПК)

Временные точки отбора образцов крови для соед. 1a [час]	Временные точки отбора образцов крови для соед. 1b [час]	Временные точки отбора образцов крови для соед. 2a-5b [час]
0,085	0,085	0,05
4,00	1	0,25
24,00	4	0,5
48,00	12	1
72,00	24	4
96,00	48	8
120,00	72	24
144,00	96	48
168	144	72
	168	168
		240
		336

Типичная фармакокинетика четырех парных конструкций антитела ViTE®-HLE представлена на фиг. 18. Каждая пара соответствует одному и тому же белку ViTE®, слитому с расширением scFc- или hetFc. Для всех белков уровни в сыворотке измеряли во всех точках времени у всех животных после введения ViTE®-HLE. Профили ФК (ПК) описывают двухфазное экспоненциальное снижение после каждого однократного введения испытуемого продукта.

Фармакокинетические параметры определяли с применением стандартных методов некомпартментального анализа, НКА (NCA). С применением некомпартментального анализа были оценены следующие параметры ФК (ПК): AUC<sub>inf</sub> (площадь под кривой концентрации в сыворотке-времени), V<sub>ss</sub> (объем распределения в стационарной фазе), CL (системный клиренс) и терминальный t<sub>1/2</sub> (терминальный период полувыведения),

Параметр ФК (ПК) для каждого испытуемого соединения суммирован как среднее значение n=2 и n=3, соответственно, в табл. 18 ниже.

Таблица 18. Фармакокинетический параметр scFc- и гетеро-Fc-вариантов разных ViTE®, связывающихся с мишенью, у яванских макак

Испытуемый продукт	Терминальный $t_{1/2}$ [час]	AUC <sub>inf</sub> [час*нг/мл]	Cl [мл/час/кг]	V <sub>ss</sub> [мл/кг]
Соединение 1a	167	6645	1,4	256
Соединение 1b	95	4955	2,6	261
Соединение 2a	213	12072	0,73	179
Соединение 2b	116	6971	0,8	78
Соединение 3a	61	3293	3,6	129
Соединение 3b	59	3633	3,3	79
Соединение 4	97	6266	1,9	180
Соединение 5a	234	24769	0,48	144
Соединение 5b	173	14639	0,82	166

В целом, AUC<sub>inf</sub> для различных пар ViTE®-HLE, связывающихся с мишенью, слитых с фрагментом -scFc или -hetFc, соответственно, составляет от 3293 час·нг/мл до 24769 час·нг/мл, в зависимости от контекста мишени ViTE®, Все анализируемые химеры HLE достигали значений системного клиренса от 0,48 до 3,6 мл/ч/кг. Соответствующие объемы распределения находились в диапазоне от 78 до 261 мл/кг.

Пример 15.

Осуществляют обмен против буфера предварительно составленных субстанций лекарственных средств, содержащих очищенные MSLN-hALB, MSLN-hFc и MSLN-scFc, соответственно, посредством ультрафильтрации/диафильтрации с применением мембран с порогом молекулярной массы, ПММ (MWCO) 10 кДа. Окончательное составление проводят путем добавления концентрированных запасных растворов. Полученные препараты для каждой конструкции приведены в табл. 19 и включают K60RTTrT, состоящий из 20 мМ фосфата калия, 150 мМ гидрохлорида L-аргинина, 6% (мас./об) трегалозы дигидрата, 0,9% (мас./об) полисорбата 80 при pH 6,0, и G40MSuT, состоящий из 10 мМ глутамата, 4% (мас./об) маннита, 2% (мас./об) сахарозы, 0,01% (мас./об) полисорбата 80, при pH 4,0. Концентрация белка-мишени составляет 1,0 мг/мл. Препаратами конструкций MЗЛН (MSLN) заполняют в объеме 1 мл стеклянные флаконы типа I, которые закупоривают пробками из бутилового каучука и алюминиевыми колпачками под обкатку. Заполненные флаконы инкубируют при -20, 5, 25 и 37°C. Один флакон каждой версии подвергают пяти циклам замораживания и оттаивания, 3/0 (F/T). Температура замораживания составляет -29°C. Целевая температура оттаивания составляет 2°C. Скорость повышения составляет приблизительно 0,3 К/мин.

Видимые механические включения оценивают обученные операторы в соответствии со способом, описанным в Европ. Фарм. 2.9.20. Количество видимых механических включений на флакон указано в табл. 7. Количество видимых (больше 125 мкм) частиц белка было выше для MSLN-hFc по сравнению с MSLN-hALB и MSLN-scFc.

Таблица 19. Количество видимых частиц белка на флакон для подвергавшихся и не подвергавшихся стрессу (T0) образцов, содержащих различные конструкции антимерозелинового (MЗЛН (MSLN)) ViTE® с увеличенным периодом полувыведения. K60RTTrT обозначает препарат, содержащий 20 мМ фосфата калия, 150 мМ гидрохлорида L-аргинина, 6% (мас./об) трегалозы дигидрата, 0,01% (мас./об) полисорбата 80, pH 6,0. G40MSuT обозначает препарат, содержащий 10 мМ глутамата, 4% (мас./об) маннита, 2% (мас./об) сахарозы, 0,01% (мас./об) полисорбата 80, pH 4,0

Конструкция	hALB	hFc		scFc	
Препарат	K60RTTrT	K60RTTrT	G40MSuT	K60RTTrT	G40MSuT
Количество видимых (больше 125 мкм) частиц белка на флакон					
T0	0	0	1	0	0
5 циклов З/О (F/T)	0	2	2	0	1
2 нед 5°C	0	2	2	0	0
2 нед 25°C	0	2	1	0	0
2 нед 37°C	0	2	2	0	0
4 нед -20°C	0	2	1	0	0
4 нед 5°C	0	1	2	0	0
4 нед 25°C	0	2	2	0	0
4 нед 37°C	0	2	2	0	0

Описанные выше образцы дополнительно анализировали при помощи сверхвысокоэффективной

эксклюзионной, ЭХ-СВЭХ (SE-UPLC) с целью количественного определения процентного содержания высокомолекулярных форм, ВМФ (HMWS). ЭХ-СВЭХ (SE-UPLC) проводят на системе СВЭХ (UPLC) AcquityH-Class (Waters) с применением колонки Acquity UPLC BEH200 SEC 150 мм (Waters). Температуру колонки устанавливают на уровне 25°C. Разделение вариантов по размеру достигается применением изократического метода со скоростью потока 0,4 мл/мин. Подвижная фаза состоит из 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ NaCl при pH 6,8. Время прогона составляет 6,0 мин. До проведения анализа образцы хранят при температуре 8°C в автосемплере. Вводят общее количество белка 3 мкг. Во избежание переноса промежуточную инъекцию 40% ацетонитрила проводят после прогона каждого образца. Обнаружение осуществляют на основе флуоресцентного излучения (возбуждение при 280 нм, эмиссия при 325 нм). Интеграцию пиков осуществляют с применением программного обеспечения Empower®. Представлена относительная площадь под кривой ВМФ (HMWS) (табл. 20).

Конструкции на основе Fc демонстрировали более низкое содержание ВМФ (HMWS) в варианте препарата G40MSuT, чем в K60RTrT, независимо от стрессовых условий. Стало очевидным, что MSLN-scFc содержит меньше ВМФ (HMWS), чем M3ЛH (MSLN)-hFc, как в G40MSuT, так и в K60RTrT препаратах. MSLN-scFc в предпочтительном препарате (G40MSuT) был менее подвержен образованию ВМФ (HMWS), чем MSLN-hALB, составленный в K60RTrT. В предыдущих экспериментах этот буфер продемонстрировал улучшенный стабилизирующий потенциал для конструкций на основе hALB по сравнению с препаратами, имеющими более кислые значения pH.

Таблица 20. Обзор содержания ВМФ (HMWS) в подвергавшихся и не подвергавшихся стрессу (T0) препаратах MSLN-hALB, -hFc и -scFc, по данным ЭХ-СВЭХ (SE-UPLC)

Конструкция	hALB	hFc		scFc	
Препарат	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
% ВМФ (HMWS)					
T0	1,8	6,7	3,3	2,5	1,3
5 циклов З/О (F/T)	2,0	7,2	4,1	3,0	1,5
2 нед 5°C	н.о.	н.о.	н.о.	2,9	1,1
2 нед 25°C	н.о.	6,6	2,7	2,4	0,5
2 нед 37°C	2,6	6,3	2,1	2,7	0,3
4 нед -20°C	5,9	8,7	1,6	6,6	0,3
4 нед 5°C	2,0	8,2	2,8	3,6	0,6
4 нед 25°C	2,2	6,8	2,6	2,7	0,4
4 нед 37°C	3,5	7,6	1,9	4,3	0,3

н.о.=не определяли

Частоту химических модификаций при термическом стрессе (инкубация при 37°C) контролируют путем картирования пептидов. Образцы белка ферментативно расщепляют, и полученные пептиды разделяют при помощи обращенно-фазовой хроматографии. Элюат колонки непосредственно вводят в источник ионизации масс-спектрометра для идентификации и количественного определения пептидов.

Для достижения максимального охвата выполняют два отдельных ферментативных расщепления: один раз с трипсином и один раз с химотрипсином. В каждом случае белки денатурируют хлоридом гуанидина и затем восстанавливают дитиотрейтолом, ДТТ (DTT). После инкубации в ДТТ (DTT) свободные остатки цистеина алкилируют добавлением йодуксусной кислоты. Затем осуществляют обмен образцов с буфером в 50 мМ Трис, pH 7,8, для расщепления. Трипсин и химотрипсин добавляют в отдельные реакционные пробирки в соотношении 1:10 (образец:фермент) каждый. Образцы расщепляют в течение 30 мин при 37°C и реакцию гасят добавлением трифторуксусной кислоты.

Отдельно осуществляют инъекцию порции 5 мкг каждого продукта расщепления в обращенно-фазовую колонку Zorbax SB-C18 (Agilent № 859700-902), уравновешенную в 0,1% (об./об) муравьиной кислоте, МК (FA). Градиент длиной 156 мин до 90% ацетонитрила, содержащего 0,1% МК (FA) применяют для элюации пептидов непосредственно в источник электрораспыления ионов масс-спектрометра Q-Exactive Plus (Thermo Scientific). Данные регистрируют в режиме, зависящем от данных, с применением метода топ 12, в котором полное сканирование (разрешение 70000, диапазон сканирования 200-2000 м/з (m/z)) сопровождается диссоциацией с высокой энергией столкновения, ВЭС (HCD) 12 наиболее распространенных ионов (разрешения 17 500).

Пептиды идентифицируют на основе точной массы и тандемного масс-спектра с применением собственного программного обеспечения. Идентификаторы верифицируют вручную. Относительные количества модифицированных и немодифицированных пептидов вычисляют на основе распространенности ионов с применением программного обеспечения Pinpoint (Thermo Scientific).

Процент химических модификаций участков определения комплементарности, YOK (CDR) и части, прудлевающей период полувыведения (hALB или Fc), обнаружений в препаратах MSLN-hALB, -hFc и -scFc, приведен в табл. 21. При сравнении аналогичных условий составления стало очевидно, что в целом

химические модификации наименее распространены в конструкциях scFc.

Таблица 21. Обзор химических модификаций в подвергавшихся и не подвергавшихся (Т0) стрессу препаратах MSLN-hALB, -hFc и -scFc по данным картирования пептидов

Конструкция	hALB		hFc		scFc	
	Препарат	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
§ дезамидирования N101 (YOK, (CDR))						
T0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
2 нед 37°C	0,7	0,8	3,0	0,7	3,2	
4 нед 37°C	1,3	н.о.	8,5	н.о.	6,4	
§ дезамидирования N162 (YOK, (CDR))						
T0	3,0	1,7	1,9	2,3	2,5	
2 нед 37°C	15,9	11,6	2,7	15,0	3,3	
4 нед 37°C	26,8	н.о.	3,7	н.о.	4,1	
§ окисления M279 (YOK, (CDR))						
T0	0,6	1,4	1,6	0,6	1,0	
2 нед 37°C	1,2	0,8	0,8	0,6	1,0	
4 нед 37°C	0,9	н.о.	0,8	н.о.	0,6	
§ дезамидирования N348 (YOK, (CDR))						
T0	0,5	3,2	3,3	0,5	0,9	
2 нед 37°C	20,5	21,6	1,9	9,4	1,3	
4 нед 37°C	22,8	н.о.	2,0	н.о.	2,9	
§ дезамидирования N351 (YOK, (CDR))						
T0	0,2	2,9	2,6	0,5	1,0	
2 нед 37°C	6,6	12,7	0,9	3,8	0,4	
4 нед 37°C	8,7	н.о.	0,8	н.о.	0,8	
§ окисления M530 (Fc)						
T0	н.д.	3,9	4,1	2,6	3,2	
2 нед 37°C	н.п.	9,0	3,1	4,0	4,3	
4 нед 37°C	н.п.	н.о.	3,4	н.о.	3,5	
§ дезамидирования N603 (Fc)						
T0	н.п.	1,3	1,9	1,3	1,4	
2 нед 37°C	н.п.	7,9	4,6	7,0	5,6	
4 нед 37°C	н.п.	н.о.	6,9	н.о.	8,1	
§ окисления M706 (Fc)						
T0	н.п.	3,2	3,6	1,5	2,1	
2 нед 37°C	н.п.	6,0	2,8	2,1	2,5	
4 нед 37°C	н.п.	н.о.	2,6	н.о.	2,0	
§ окисления M587 (hALB)						
T0	1,0	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.	
2 нед 37°C	2,2	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.	
4 нед 37°C	2,3	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.	
§ окисления M623 (hALB)						
T0	1,9	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.	
2 нед 37°C	2,4	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.	
4 нед 37°C	3,0	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.	
§ окисления M798 (hALB)						
T0	1,4	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.	
2 нед 37°C	3,3	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.	
4 нед 37°C	3,5	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.	
§ окисления M829 (hALB)						
T0	8,9	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.	
2 нед 37°C	42,9	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.	
4 нед 37°C	44,1	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.	

н.п.=неприменимо; н.о.=не определяли

Пример 16.

M3LN (MSLN)-hALB, -hFc, -scFc, составленные так, как описано в примере 15, подвергали эксперименту с прыжком рН. Концентрация исходных веществ составляет 1,0 мг/мл. В стеклянный флакон

помещают объем 0,38 мл каждого исходного материала. После предварительной обработки при 37°C растворы нагружают 20-кратным фосфатно-солевым буфером, ФСБ (PBS), который состоит из 0,090 М фосфата калия, 0,480 М фосфата натрия (оба двухосновные), 0,052 М хлорида калия и 2,76 М NaCl. Нагруженные образцы инкубируют при 37°C в течение двух недель. После инкубации их анализируют при помощи ЭХ-ВСЭХ (SE-UPLC) с применением способа, описанного в примере 15, и регистрируют процентное содержание ВМФ (HMWS) (табл. 22). При сравнении всех конструкций, составленных в K60RTrT, содержание ВМФ (HMWS) увеличивалось в следующем порядке: hALB меньше чем scFc меньше чем hFc. Кроме того, MSLN-scFc продемонстрировал более низкое содержание ВМФ (HMWS), чем MSLN-hFc, если он был составлен в G40MSuT.

Таблица 22. Обзор содержания ВМФ (HMWS) в подвергавшихся стрессу препаратах (рН-скачок плюс 2 нед 37°C) МЗЛН (MSLN)-hALB, -hFc и -scFc по данным ЭХ-ВСЭХ (SE-UPLC)

Конструкция	hALB		hFc		scFc	
	К60RTrT	К60RTrT	G40MSuT	К60RTrT	G40MSuT	
% ВМФ (HMWS)						
2 нед 37°C	1,5	8,3	7,1	5,4	5,1	

Пример 17.

МЗЛН (MSLN)-hALB, -hFc и -scFc, составленные, как описано в примере 15, подвергают стрессу при перемешивании. Концентрация исходных веществ составляет 1,0 мг/мл. Объем 0,5 мл каждого раствора фильтруют сквозь соответствующий фильтр с размером пор 0,22 мкм и помещают в стеклянные флаконы емкостью 3 см. Флаконы помещают в пластиковую коробку таким образом, чтобы флаконы не перемещались внутри коробки во время взбалтывания. Коробку помещают на орбитальный шейкер. Образцы перемешивают при 500 об/минут в течение 65 ч. Видимые механические включения оценивают в соответствии со способом, описанным в Европ. Фарм. 2.9.20. Способ осуществляется обученными операторами. Количество видимых механических включений на флакон указано в табл. 23. Видимые частицы белка наблюдались только в препаратах MSLN-hFc.

Таблица 23. Количество видимых частиц белка на флакон в перемешиваемых образцах

Конструкция	hALB		hFc		scFc	
	К60RTrT	К60RTrT	G40MSuT	К60RTrT	G40MSuT	
Количество видимых (больше 125 мкм) частиц белка на флакон						
65 час, 500 об/мин	0	1	1	0	0	

Кроме того, вышеуказанные образцы анализировали при помощи сверхвысокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ЭХ-ВСЭХ (SE-UPLC)) с количественной оценкой процентного содержания высокомолекулярных форм (ВМФ (HMWS)). Применяют тот же способ, что и в примере 15. Содержание ВМФ (HMWS) в перемешиваемых образцах приведено в табл. 24. При сравнении препаратов K60RTrT образование ВМФ (HMWS) было наиболее выраженным в MSLN-hFc. Для конструкций на основе Fc содержание ВМФ (HMWS) можно уменьшить, снизив рН препарата (G40MSuT). Но ВМФ (HMWS) также были более распространенными в MSLN-hFc, чем в MSLN-scFc.

Таблица 24. Обзор содержания ВМФ (HMWS) в подвергавшихся стрессу (скачок рН плюс 2 нед 37°C) препаратах MSLN-hALB, -hFc и -scFc по данным ЭХ-ВСЭХ (SE-UPLC)

Конструкция	hALB		hFc		scFc	
	К60RTrT	К60RTrT	G40MSuT	К60RTrT	G40MSuT	
% ВМФ (HMWS)						
65 час, 500 об/мин	1,8	5,8	2,4	1,8	0,3	

Пример 17.

МЗЛН (MSLN)-hALB, -hFc и -scFc, составленные, как описано в примере 15, подвергают воздействию видимого и ультрафиолетового спектра А, УФА (UVA) света (фотостресс). Во всех препаратах концентрация белка составляет 1 мг/мл. Растворы белка фильтруют сквозь фильтр с размером пор 0,22 мкм и помещают в объеме 0,5 мл в стеклянные флаконы типа I. MSLN-hALB и -scFc подвергают двум различным испытаниям, включая 0,2 Люкс видимого света/25 Вт·час/м<sup>2</sup> света УФА (UVA) и 1,2 МЛюкс видимого света/173 Вт·час/м<sup>2</sup> соответственно. MSLN-hFc подвергают двум различным испытаниям, включая 0,2 МЛюкс видимого света без света УФА (UVA) и 1,2 МЛюкс видимого света /30 Вт·час/м<sup>2</sup>, соответственно. Температуру камеры доводят до 25°C. После облучения образцы анализируют при помощи визуальной инспекции (табл. 25), ЭХ-ВСЭХ (SE-UPLC) (табл. 26) и пептидного картирования (табл. 27). Вышеупомянутые способы осуществляют в соответствии с методиками, описанными в примере 15. Хотя MSLN-hALB и -scFc подвергались воздействию более высоких доз УФА (UVA)-света, не наблюдалось видимых белковых частиц, тогда как в образцах MSLN-hFc наблюдалась одна видимая белковая частица на флакон в обоих испытаниях, независимо от препарата.

Таблица 25. Обзор количества видимых белковых частиц на флакон в препаратах MSLN-hALB, -hFc и -scFc, определенного после воздействия света

Конструкция	hALB	hFc		scFc	
Препарат	K60RTTrT	K60RTTrT	G40MSuT	K60RTTrT	G40MSuT
Количество видимых (больше 125 мкм) частиц белка на флакон					
T0	0	0	1	0	0
Испытание 1	0 <sup>1)</sup>	1 <sup>2)</sup>	1 <sup>2)</sup>	0 <sup>1)</sup>	0 <sup>1)</sup>
Испытание 2	0 <sup>3)</sup>	1 <sup>4)</sup>	1 <sup>4)</sup>	0 <sup>3)</sup>	0 <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 0,2 МЛюкс видимого света /25 Вт·час/м<sup>2</sup> свет УФА (UVA),

<sup>2)</sup> 0,2 МЛюкс видимого света без света УФА (UVA),

<sup>3)</sup> 1,2 МЛюкс видимого света /173 Вт·час/м<sup>2</sup>,

<sup>4)</sup> 1,2 МЛюкс видимого света/30 Вт·час/м<sup>2</sup>

Содержание ВМФ (HMWS) увеличивается в следующем порядке MSLN-hALB меньше чем -scFc меньше чем -hFc, если белок был составлен в K60RTTrT. Содержание ВМФ (HMWS) может быть снижено для конструкций на основе Fc, если они составлены в G40MSuT. Однако ВМФ (HMWS) также были менее распространенными в MSLN-scFc. MSLN-hFc продемонстрировал особенную чувствительность к воздействию УФА (UVA) света.

Таблица 26. Обзор содержания ВМФ (HMWS) в препаратах MSLN-hALB, -hFc и -scFc после воздействия света по данным ЭХ-ВСЭХ (SE-UPLC)

Конструкция	hALB	hFc		scFc	
Препарат	K60RTTrT	K60RTTrT	G40MSuT	K60RTTrT	G40MSuT
§ ВМФ (HMWS)					
T0	1,8	6,7	3,3	2,5	1,3
Испытание 1	1,8 <sup>1)</sup>	6,3 <sup>2)</sup>	2,5 <sup>2)</sup>	2,1 <sup>1)</sup>	0,4 <sup>1)</sup>
Испытание 2	2,0 <sup>3)</sup>	11,0 <sup>4)</sup>	2,1 <sup>4)</sup>	2,4 <sup>3)</sup>	0,3 <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 0,2 МЛюкс видимого света /25 Вт·час/м<sup>2</sup> свет УФА (UVA),

<sup>2)</sup> 0,2 МЛюкс видимого света без света УФА (UVA),

<sup>3)</sup> 1,2 МЛюкс видимого света /173 Вт·час/м<sup>2</sup>,

<sup>4)</sup> 1,2 МЛюкс видимого света/30 Вт·час/м<sup>2</sup>

Процент химической модификации участков определения комплементарности, УОК (CDR) и части, увеличивающей период полувыведения (или hALB или Fc), обнаруженный в препаратах MSLN-hALB, -hFc и -scFc, приведен в табл. 27. При сравнении аналогичных условий составления, стало очевидно, что в целом химические модификации наименее распространены в конструкциях scFc.



Таблица 27. Обзор химических модификаций в препаратах МЗЛН (MSLN)-hALB, -hFc и -scFc после воздействия света по данным картирования пептидов

Конструкция	hALB	hFc		scFc	
Препарат	K60RTTrT	K60RTTrT	G40MSuT	K60RTTrT	G40MSuT
% дезамидирования N101 (YOK (CDR))					
T0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
Испытание 1	0,2 <sup>1)</sup>	н.о.	0,3 <sup>2)</sup>	н.о.	0,5 <sup>3)</sup>
Испытание 2	0,2 <sup>3)</sup>	н.о.	0,6 <sup>4)</sup>	н.о.	0,7 <sup>3)</sup>
% дезамидирования N162 (YOK (CDR))					
T0	3,0	1,7	1,9	2,3	2,5
Испытание 1	3,0 <sup>1)</sup>	н.о.	2,1 <sup>2)</sup>	н.о.	2,7 <sup>1)</sup>
Испытание 2	3,6 <sup>3)</sup>	н.о.	3,1 <sup>4)</sup>	н.о.	2,8 <sup>3)</sup>
% окисления M279 (YOK (CDR))					
T0	0,6	1,4	1,6	0,6	1,0
Испытание 1	0,8 <sup>1)</sup>	н.о.	2,6 <sup>2)</sup>	н.о.	0,6 <sup>1)</sup>
Испытание 2	1,0 <sup>3)</sup>	н.о.	6,3 <sup>4)</sup>	н.о.	0,7 <sup>3)</sup>
% дезамидирования N348 (YOK (CDR))					
T0	0,5	3,2	3,3	0,5	0,9
Испытание 1	0,4 <sup>1)</sup>	н.о.	2,7 <sup>2)</sup>	н.о.	0,2 <sup>1)</sup>
Испытание 2	0,9 <sup>3)</sup>	н.о.	3,9 <sup>4)</sup>	н.о.	0,2 <sup>3)</sup>
% дезамидирования N351 (YOK (CDR))					
T0	0,2	2,9	2,6	0,5	1,0
Испытание 1	0,4 <sup>1)</sup>	н.о.	2,0 <sup>2)</sup>	н.о.	0,3 <sup>1)</sup>
Испытание 2	0,5 <sup>3)</sup>	н.о.	2,6 <sup>4)</sup>	н.о.	0,3 <sup>3)</sup>
% окисления M530 (Fc)					
T0	н.п.	3,9	4,1	2,6	3,2
Испытание 1	н.п.	н.о.	7,6 <sup>2)</sup>	н.о.	3,1 <sup>1)</sup>
Испытание 2	н.п.	н.о.	21,8 <sup>4)</sup>	н.о.	4,1 <sup>3)</sup>
% окисления M706 (Fc)					
T0	н.п.	3,2	3,6	1,5	2,1
Испытание 1	н.п.	н.о.	6,5 <sup>2)</sup>	н.о.	1,8 <sup>1)</sup>
Испытание 2	н.п.	н.о.	17,8 <sup>4)</sup>	н.о.	2,7 <sup>3)</sup>
% окисления M587 (hALB)					
T0	1,0	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
Испытание 1	1,5	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
Испытание 2	2,4	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
% окисления M623 (hALB)					
T0	1,9	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
Испытание 1	4,0	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
Испытание 2	4,1	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
% окисления M798 (hALB)					
T0	1,4	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
Испытание 1	2,1	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
Испытание 2	3,1	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
% окисления M829 (hALB)					
T0	8,9	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
Испытание 1	31,0	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
Испытание 2	25,2	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.

н.п.=неприменимо;

н.о.=не определяли

#### Пример 18.

MSLN-hALB был составлен в K60RTTrT, а MSLN-scFc был составлен в G40MSuT в соответствии с методикой, описанной в примере 15. Концентрации белка составляют 0,05 мг/мл. В стеклянные (боросиликатные, тип I, флакон 13 мм вместимостью 3 см<sup>3</sup> производства West, арт. № 68000375) и полипропиленовые (2 мл с 0-кольцом, например, производства Sarstedt, арт. № 72.694.005) испытательные емкости помещают 500 мкл испытуемого раствора. Испытуемый раствор оставляют на 5 мин в первой испытательной емкости. Затем для анализа отбирают аликвоты 150 мкл. Оставшийся испытуемый раствор (350 мкл) последовательно переносят из одной испытательной емкости в следующую (всего пять емкостей). В каждом флаконе раствор оставляют на 5 мин до следующего переноса. Один и тот же наконечник пипетки используют для каждой стадии переноса. Такое же испытание проводят с применением 30 мл поликарбонатных бутылей (Nalgene, PCS-000295 с крышкой, PP/20-415/ZTPE). Для этого вида емкостей в первую емкость помещают 5 мл. После отбора аликвоты по 150 мкл остаточный объем переносят из одной испытательной емкости в следующую (в соответствии с методикой, описанной выше). Образцы,

извлеченные из емкостей № 1 и № 5, анализируют при помощи ЭХ-ВСЭХ (SE-UPLC) (способ описан в примере 15). Кроме того, для определения концентрации белка проводят обнаружение белка при помощи детектора с фотодиодной матрицей, ДФМ (PDA) (280 нм). Процентный выход белка из каждой испытательной емкости приведен в табл. 28. Было показано, что извлечение белка было более выраженным для MSLN-scFc, чем для MSLN-hALB, независимо от вида емкости.

Таблица 28. Выделение белка из разных видов емкостей для MSLN-hALB и -scFc по данным ЭХ-ВСЭХ (SE-UPLC)

Конструкция	hALB	scFc
Препарат	K60RTtT	G40MSuT
§ Выделения белка (от теоретического)		
Стекло типа I	80,0	92,0
Полипропилен	87,0	97,3
Поликарбонат	87,0	96,0

#### Пример 19.

MSLN-hALB составляют в K60RTtT, а MSLN-scFc составляют в K60RTtT и G40MSuT в соответствии с методикой, описанной в примере 15. Концентрация белка составляет 1,0 мг/мл. 1950 мкл каждого испытуемого раствора нагружают 50 мкл стандартного раствора кремния 1000 пропромилле (Specpure производства AlfaAesar, арт. № 38717), что дает нагрузку 25 пропромилле. Контрольным образцом служит ненагруженный испытуемый раствор. Нагруженный испытуемый раствор, а также контрольный образец помещают в стеклянные флаконы емкостью 3 см<sup>3</sup> типа I и инкубируют при 37°C в течение 24 ч. Все образцы анализируют при помощи ЭХ-ВСЭХ (SE-UPLC) в соответствии со способом, описанным в примере 15, для количественного определения ВМФ (HMWS) (табл. 29). При составлении в K60RTtT MSLN-hALB и -scFc демонстрируют аналогичное повышение содержания ВМФ (HMWS) при нагрузке кремнием. Для конструкции scFc можно было увидеть, что степень выраженности такого повышения может быть уменьшена путем снижения pH композиции до 4,0. Согласно предварительным экспериментам, этот подход не был возможным для MSLN-hALB, так как обнаружено, что он подвергается фрагментации при значениях pH препарата 5,0 и ниже.

Таблица 29. Обзор содержания ВМФ (HMWS) в препаратах MSLN-hALB и -scFc по данным ЭХ-ВСЭХ (SE-UPLC) после нагрузки 25 пропромилле кремния

Конструкция	hALB	scFc	
Препарат	K60RTtT	K60RTtT	G40MSuT
Δ % ВМФ (HMWS) (по сравнению с ненагруженным контролем)			
Нагрузка 25 пропромилле	1,0	1,0	0,2

Таблица 30. Перечень последовательностей

SEQ ID No:	Описание	Источник	Последовательность
1.	Пептидный линкер	искусственный	GGGG
2.	Пептидный линкер	искусственный	GGGGS
3.	Пептидный линкер	искусственный	GGGGQ
4.	Пептидный линкер	искусственный	PGGGGS
5.	Пептидный линкер	искусственный	PGGDGS
6.	Пептидный линкер	искусственный	SGGGGS
7.	Пептидный линкер	искусственный	GGGSGGGGS
8.	Пептидный линкер	искусственный	GGGSGGGGS
9.	Пептидный линкер	искусственный	GGGSGGGSGGGGS
10.	Гекса-гистидин	искусственный	NNNNNN
11.	CDR-L1 F6A	искусственный	GSSTGAVTSGYYPN
12.	CDR-L2 F6A	искусственный	GTKFLAP
13.	CDR-L3 F6A	искусственный	ALWYSNRWV
14.	CDR-H1 F6A	искусственный	IYAMN

15.	CDR-H2 F6A	искусственный	RIRSKYNNYATYYADSVKS
16.	CDR-H3 F6A	искусственный	HGNFGNSYVSPFAY
17.	VH F6A	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNIIYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSPFAYWGQGTLLVTVSS
18.	VL F6A	искусственный	QTVVTTQEPESLTVSPGGTIVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKTLLTVL
19.	VH-VL F6A	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNIIYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSPFAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGGQTVVTTQEPESLTV SPGGTIVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCALWYSNRWVFGGKTLLTVL
20.	CDR-L1 H2C	искусственный	GSSTGAVTSGYYPN
21.	CDR-L2 H2C	искусственный	GTKFLAP
22.	CDR-L3 H2C	искусственный	ALWYSNRWV
23.	CDR-H1 H2C	искусственный	KYAMN
24.	CDR-H2 H2C	искусственный	RIRSKYNNYATYYADSVKD
25.	CDR-H3 H2C	искусственный	HGNFGNSYISYWAY
26.	VH H2C	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSS
27.	VL H2C	искусственный	QTVVTTQEPESLTVSPGGTIVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKTLLTVL
28.	VH-VL H2C	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGGQTVVTTQEPESLTV SPGGTIVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCALWYSNRWVFGGKTLLTVL
29.	CDR-L1 H1E	искусственный	GSSTGAVTSGYYPN
30.	CDR-L2 H1E	искусственный	GTKFLAP
31.	CDR-L3 H1E	искусственный	ALWYSNRWV
32.	CDR-H1 H1E	искусственный	SYAMN
33.	CDR-H2 H1E	искусственный	RIRSKYNNYATYYADSVKG
34.	CDR-H3 H1E	искусственный	HGNFGNSYLSFWAY
35.	VH H1E	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNSYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSFWAYWGQGTLLVTVSS
36.	VL H1E	искусственный	QTVVTTQEPESLTVSPGGTIVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKTLLTVL
37.	VH-VL H1E	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNSYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSFWAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGGQTVVTTQEPESLTV SPGGTIVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCALWYSNRWVFGGKTLLTVL
38.	CDR-L1 G4H	искусственный	GSSTGAVTSGYYPN
39.	CDR-L2 G4H	искусственный	GTKFLAP
40.	CDR-L3 G4H	искусственный	ALWYSNRWV
41.	CDR-H1 G4H	искусственный	RYAMN
42.	CDR-H2 G4H	искусственный	RIRSKYNNYATYYADSVKG
43.	CDR-H3 G4H	искусственный	HGNFGNSYLSYFAY
44.	VH G4H	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNRYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYFAYWGQGTLLVTVSS
45.	VL G4H	искусственный	QTVVTTQEPESLTVSPGGTIVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKTLLTVL
46.	VH-VL G4H	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNRYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYFAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGGQTVVTTQEPESLTV SPGGTIVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCALWYSNRWVFGGKTLLTVL
47.	CDR-L1 A2J	искусственный	RSSTGAVTSGYYPN
48.	CDR-L2 A2J	искусственный	ATDMRPS

49.	CDR-L3 A2J	искусственный	ALWYSNRWV
50.	CDR-H1 A2J	искусственный	VYAMN
51.	CDR-H2 A2J	искусственный	RIRSKYNNYATYYADSVKK
52.	CDR-H3 A2J	искусственный	HGNFGNSYLSWWAY
53.	VH A2J	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNVYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKKRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWWAYWGQGLTLTVSS
54.	VL A2J	искусственный	QTVVTTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGATDMRPSGTPARFSGSLGGKAALT LSGVQPEDEAEYCALWYSNRWVFGGKTLTVL
55.	VH-VL A2J	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNVYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKKRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWWAYWGQGLTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTQTVVTTQEPSTLV SPGGTVTLTCSRSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGATDMRPSGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCALWYSNRWVFGGKTLTVL
56.	CDR-L1 E1L	искусственный	GSSTGAVTSGYYPN
57.	CDR-L2 E1L	искусственный	GTKFLAP
58.	CDR-L3 E1L	искусственный	ALWYSNRWV
59.	CDR-H1 E1L	искусственный	KYAMN
60.	CDR-H2 E1L	искусственный	RIRSKYNNYATYYADSVKS
61.	CDR-H3 E1L	искусственный	HGNFGNSYTSYYAY
62.	VH E1L	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYTSYYAYWGQGLTLTVSS
63.	VL E1L	искусственный	QTVVTTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALT LSGVQPEDEAEYCALWYSNRWVFGGKTLTVL
64.	VH-VL E1L	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYTSYYAYWGQGLTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTQTVVTTQEPSTLV SPGGTVTLTCSRSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCALWYSNRWVFGGKTLTVL
65.	CDR-L1 E2M	искусственный	RSSTGAVTSGYYPN
66.	CDR-L2 E2M	искусственный	ATDMRPS
67.	CDR-L3 E2M	искусственный	ALWYSNRWV
68.	CDR-H1 E2M	искусственный	GYAMN
69.	CDR-H2 E2M	искусственный	RIRSKYNNYATYYADSVKE
70.	CDR-H3 E2M	искусственный	HRNFGNSYLSWFAY
71.	VH E2M	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKERFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWFAYWGQGLTLTVSS
72.	VL E2M	искусственный	QTVVTTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGATDMRPSGTPARFSGSLGGKAALT LSGVQPEDEAEYCALWYSNRWVFGGKTLTVL
73.	VH-VL E2M	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKERFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWFAYWGQGLTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTQTVVTTQEPSTLV SPGGTVTLTCSRSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGATDMRPSGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCALWYSNRWVFGGKTLTVL
74.	CDR-L1 F70	искусственный	GSSTGAVTSGYYPN
75.	CDR-L2 F70	искусственный	GTKFLAP
76.	CDR-L3 F70	искусственный	ALWYSNRWV
77.	CDR-H1 F70	искусственный	VYAMN
78.	CDR-H2 F70	искусственный	RIRSKYNNYATYYADSVKK
79.	CDR-H3 F70	искусственный	HGNFGNSYISWWAY
80.	VH F70	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNVYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKKRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISWWAYWGQGLTLTVSS
81.	VL F70	искусственный	QTVVTTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALT LSGVQPEDEAEYCALWYSNRWVFGGKTLTVL
82.	VH-VL F70	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNVYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKKRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISWWAYWGQGLTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTQTVVTTQEPSTLV SPGGTVTLTCSRSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCALWYSNRWVFGGKTLTVL

83.	CDR-L1 F12Q	искусственный	GSSTGAVTSGNYPN
84.	CDR-L2 F12Q	искусственный	GTKFLAP
85.	CDR-L3 F12Q	искусственный	VLWYSNRWV
86.	CDR-H1 F12Q	искусственный	SYAMN
87.	CDR-H2 F12Q	искусственный	RIRSKYNNYATYYADSVKG
88.	CDR-H3 F12Q	искусственный	HGNFGNSYVSWWAY
89.	VH F12Q	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNSYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTAYLQMNMLKTEDTAVYYCVRHGNGNSYVSWWAYWQGTLVTVSS
90.	VL F12Q	искусственный	QTVVTTQEPFSLTVSPGGTIVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALT LSGVQPEDEAEYCYVWYSNRWVFGGGTKLTVL
91.	VH-VL F12Q	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNSYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTAYLQMNMLKTEDTAVYYCVRHGNGNSYVSWWAYWQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGQTVVTTQEPFSLTV SPGGTIVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLSGVQPEDEAEY CYVWYSNRWVFGGGTKLTVL
92.	CDR-L1 I2C	искусственный	GSSTGAVTSGNYPN
93.	CDR-L2 I2C	искусственный	GTKFLAP
94.	CDR-L3 I2C	искусственный	VLWYSNRWV
95.	CDR-H1 I2C	искусственный	KYAMN
96.	CDR-H2 I2C	искусственный	RIRSKYNNYATYYADSVKD
97.	CDR-H3 I2C	искусственный	HGNFGNSYISWAY
98.	VH I2C	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNMLKTEDTAVYYCVRHGNGNSYISWAYWQGTLVTVSS
99.	VL I2C	искусственный	QTVVTTQEPFSLTVSPGGTIVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALT LSGVQPEDEAEYCYVWYSNRWVFGGGTKLTVL
100.	VH-VL I2C	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNMLKTEDTAVYYCVRHGNGNSYISWAYWQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGQTVVTTQEPFSLTV SPGGTIVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLSGVQPEDEAEY CYVWYSNRWVFGGGTKLTVL
101.	VH F12q	искусственный	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAASGFTFNSYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTAYLQMNMLKTEDTAVYYCVRHGNGNSYVSWWAYWQGTLVTVSS
102.	VL F12q	искусственный	QTVVTTQEPFSLTVSPGGTIVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALT LSGVQPEDEAEYCYVWYSNRWVFGGGTKLTVL
103.	F12q	scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAASGFTFNSYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTAYLQMNMLKTEDTAVYYCVRHGNGNSYVSWWAYWQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGQTVVTTQEPFSLTV SPGGTIVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLSGVQPEDEAEY CYVWYSNRWVFGGGTKLTVL
104.	HALB	человек	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVREPDVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHYPFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKLELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVDLTKVHTTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHCEYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLEFBLQGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAMDDFAAFVEKCKADDKETCFABEGKLVAAASQAALGL
105.	HALB7	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVREPDVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHYPFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKLELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVDLTKVHTTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHCEYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLEFBLQGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAMDDFAAFVEKCKADDKETCFABEGKLVAAASQAALGL
106.	HALB098	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVREPDVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHYPFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKLELDRDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF

			AEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLECCADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHCEYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPKAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
107.	HALB114	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEBNFKALVLIAPAQYLQCCPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLECCADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHCEYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPKAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
108.	HALB254	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEBNFKALVLIAPAQYLQCCPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLECCADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHCEYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPKAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
109.	HALB253	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEBNFKALVLIAPAQYLQCCPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLECCADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHCEYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPKAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
110.	HALB131	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEBNFKALVLIAPAQYLQCCPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLECCADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHCEYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPKAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
111.	HALB135	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEBNFKALVLIAPAQYLQCCPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLECCADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHCEYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPKAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
112.	HALB133	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEBNFKALVLIAPAQYLQCCPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLECCADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHCEYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPKAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
113.	HALB234	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEBNFKALVLIAPAQYLQCCPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF

			AEVSKLVDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGQYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTCCCTESLVNRRPCFSALEVDVETYPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKTCFAEEGPKLVAASQAALGL
114.	HALB C34S	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYIQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGQYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTCCCTESLVNRRPCFSALEVDVETYPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKTCFAEEGPKLVAASQAALGL
115.	HALB7 C34S	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYIQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGQYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTCCCTESLVNRRPCFSALEVDVETYPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKTCFAEEGPKLVAASQAALGL
116.	HALB098 C34S	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYIQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGQYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTCCCTESLVNRRPCFSALEVDVETYPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKTCFAEEGPKLVAASQAALGL
			VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKTCFAEEGPKLVAASQAALGL
117.	HALB114 C34S	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYIQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGQYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTCCCTESLVNRRPCFSALEVDVETYPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKTCFAEEGPKLVAASQAALGL
118.	HALB254 C34S	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYIQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGQYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTCCCTESLVNRRPCFSALEVDVETYPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKTCFAEEGPKLVAASQAALGL
119.	HALB253 C34S	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYIQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGQYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTCCCTESLVNRRPCFSALEVDVETYPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKTCFAEEGPKLVAASQAALGL
120.	HALB131 C34S	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYIQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEF

			AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECCCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLLRKAKTYETTLKCCAAADPHCYAKVDFDEPKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
121.	HALB135 C34S	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQOSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECCCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLLRKAKTYETTLKCCAAADPHCYAKVDFDEPKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
122.	HALB133 C34S	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQOSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECCCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLLRKAKTYETTLKCCAAADPHCYAKVDFDEPKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
123.	HALB234 C34S	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQOSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECCCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLLRKAKTYETTLKCCAAADPHCYAKVDFDEPKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
			VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
124.	HALB C34A	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQOSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECCCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLLRKAKTYETTLKCCAAADPHCYAKVDFDEPKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
125.	HALB7 C34A	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQOSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECCCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLLRKAKTYETTLKCCAAADPHCYAKVDFDEPKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
126.	HALB098 C34A	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQOSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECCCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVLLLRKAKTYETTLKCCAAADPHCYAKVDFDEPKPL VEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQATLVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
127.	HALB114 C34A	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQOSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDMCTAFHDNEETFLKLYEYIARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF



			AEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECECEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFGLMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTFLEKCCAAADPHCEYAKVDFEFPKPL VEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEITYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFEAEEGPHLVAASKAALGL
128.	HALB254 C34A	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKGFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECECEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFGLMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTFLEKCCAAADPHCEYAKVDFEFPKPL VEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEITYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFEAEEGPHLVAASKAALGL
129.	HALB253 C34A	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKGFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECECEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFGLMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTFLEKCCAAADPHCEYAKVDFEFPKPL VEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEITYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFEAEEGPHLVAASKAALGL
130.	HALB131 C34A	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKGFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECECEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFGLMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTFLEKCCAAADPHCEYAKVDFEFPKPL VEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEITYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFEAEEGPHLVAASKAALGL
131.	HALB135 C34A	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKGFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECECEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFGLMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTFLEKCCAAADPHCEYAKVDFEFPKPL VEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEITYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFEAEEGPHLVAASKAALGL
132.	HALD133 C34A	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKGFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECECEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFGLMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTFLEKCCAAADPHCEYAKVDFEFPKPL VEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEITYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFEAEEGPHLVAASKAALGL
133.	HALB234 C34A	искусственный	DAHKSEVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAQRLKASLQKGFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECECEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPS LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFGLMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTFLEKCCAAADPHCEYAKVDFEFPKPL VEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEITYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFEAEEGPHLVAASKAALGL
134.	Ab156	искусственный	RDWDFDVFGGGTPVGG
135.	линейный FcRn связывающий	искусственный	QRFTVGHFGGLXPANG

	пептид		
136.	линейный FcRn связывающий пептид Y	искусственный	QRFVTGHFGGLYPANG
137.	линейный FcRn связывающий пептид H	искусственный	QRFVTGHFGGLHPANG
138.	ядерный FcRn связывающий пептид H	искусственный	TGHFGGLHP
139.	циклический FcRn связывающий пептид H	искусственный	QRFCTGHFGGLHPCNG
140.	Кросс-тело 1 HC		ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFFAVLQSSGLYSLSVVTVFSSSL GTQTYICNVNHNKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPRE PQVYITLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSCLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
141.	Кросс-тело 1 LC		GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTP EQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQ PREPQVYITLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSCLTVDKSRWQ QGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
142.	Кросс-тело 2 HC		ASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFFAVLQSSGLYSLSVVTVFSSNF GTQTYICNVNHNKPSNTKVDKVEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPRE PQVYITLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSCLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
143.	Кросс-тело 2 LC		GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTP EQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSKSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI S KAKGQPREPQVYITLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSCLTVD KSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
144.	Гетеро-Fc связывающий агент Fc		DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQY GSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSRREMTKNQVSLTCLVKG YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSCLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
145.	Гетеро-Fc партнер Fc		DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQY GSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSRREMTKNQVSLTCLVKG YPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSCLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
146.	Макситело 1 целевой Fc		EPKSSDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP CEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSRREMTKNQVSLT CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSCLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
147.	Макситело 1 CD3 Fc		EPKSSDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP CEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSRREMTKNQVSLT CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSCLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
148.	Макситело 2 целевой Fc		EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSRREMTKNQVSLT CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSCLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
149.	Макситело 2 CD3 Fc		EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSRREMTKNQVSLT CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSCLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK

150.	Моно Fc		APELLGGPSVFLFPFKKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI S KAKGQPREPQVITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPFENNYDTTTPVLDSDGSEFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CVMHEALHNYHQKLSLSLSPGK
151.	MS_1	VH CDR1	SSSYWG
152.	MS_1	VH CDR2	SIYYSGITNYNPSLKS
153.	MS_1	VH CDR3	PSNYDAFDI
154.	MS_1	VL CDR1	TGSSSNIGAGYDVH
155.	MS_1	VL CDR2	GNSKRFS
156.	MS_1	VL CDR3	QSYDSSLGGWV
157.	MS_1	VH	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITNYNPSLKSRTVISVDT S KNQFSLKLSVTAADTAVYYCARPSNYDAFDI WQGTMTVSS
158.	MS_1	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRTVTSCTGSSNIGAGYDVHWYQQVPTGAPKLLIYGNPKRPSGVPDRFSGSKGTSASLA ITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGGWVFGGKTLTVL
159.	MS_1	scFv	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITNYNPSLKSRTVISVDT S KNQFSLKLSVTAADTAVYYCARPSNYDAFDI WQGTMTVSSSGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRTV TSCTGSSNIGAGYDVHWYQQVPTGAPKLLIYGNPKRPSGVPDRFSGSKGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYD SSLGGWVFGGKTLTVL
160.	MS_1	Биспецифическая молекула	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITNYNPSLKSRTVISVDT S KNQFSLKLSVTAADTAVYYCARPSNYDAFDI WQGTMTVSSSGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRTV TSCTGSSNIGAGYDVHWYQQVPTGAPKLLIYGNPKRPSGVPDRFSGSKGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYD SSLGGWVFGGKTLTVLSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRS KYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSIYSWAYWGQGLTVTVSSGGG SGGGSGGGGSGTAVTQEPSTVSPGGTTLTCSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARF S GLLGKAALTLSGVQPEDEAEYCYVLYSNRWVFGGKTLTVL
161.	MS_2	VH CDR1	DHYMS
162.	MS_2	VH CDR2	YISSSGSTIYYADSVKG
163.	MS_2	VH CDR3	DLGPFSDY
164.	MS_2	VL CDR1	RASQGISSWLA
165.	MS_2	VL CDR2	AASRLQS
166.	MS_2	VL CDR3	QQANSFPRT
167.	MS_2	VH	QVQLVESGGGVQPGKSLRSLCAASGFTFSDHYMSWIRQTPGKLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDLGPSPFDYWGQGLVTVSS
168.	MS_2	VL	DIQMTQSPSSVSASVGRVITITCRASQGISWLAWYQQKPKGAPKLLIDAASRLQSGVPSRFSGSGSDFTLTI S SLQPEDFATYYCQANSFPRTFGQGTKVEIK
169.	MS_2	scFv	QVQLVESGGGVQPGKSLRSLCAASGFTFSDHYMSWIRQTPGKLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDLGPSPFDYWGQGLVTVSSSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGRVIT ITCRASQGISWLAWYQQKPKGAPKLLIDAASRLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQANSFPRT FGQGTKVEIK
170.	MS_2	Биспецифическая молекула	QVQLVESGGGVQPGKSLRSLCAASGFTFSDHYMSWIRQTPGKLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDLGPSPFDYWGQGLVTVSSSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGRVIT ITCRASQGISWLAWYQQKPKGAPKLLIDAASRLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQANSFPRT FGQGTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRS KYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSIYSWAYWGQGLTVTVSSGGG SGGGSGTAVTQEPSTVSPGGTTLTCSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYCYVLYSNRWVFGGKTLTVL
171.	MS_3	VH CDR1	DYYMT
172.	MS_3	VH CDR2	YISSSGSTIYYADSVKG
173.	MS_3	VH CDR3	DRNSHFDY
174.	MS_3	VL CDR1	RASGITRWLA
175.	MS_3	VL CDR2	AASVLOS
176.	MS_3	VL CDR3	QQNSFPRT
177.	MS_3	VH	QVQLVESGGGLVQPGKSLRSLCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGLTVTVSS
178.	MS_3	VL	DIQMTQSPSSVSASVGRVITITCRASQGITRWLAWYQQKPKGAPKLLIYAASVLSQGVPSRFSGSGSDFTLTI S

			SLQPEDFATYYCQQSNSFPRTFGQGTKVEIK
179.	MS_3	scFv	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWISYISSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQGITRWLAWYQQKPKGKAPKLLIYAASVLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNSFP TFGQGTKVEIK
180.	MS_3	Биспецифическая молекула	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWISYISSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQGITRWLAWYQQKPKGKAPKLLIYAASVLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNSFP TFGQGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGLTVTVSSGGGGSGGGG GGGGSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKLTVL
181.	MS_4	VH CDR1	DYYMT
182.	MS_4	VH CDR2	YISSSGSTIYYADSVKG
183.	MS_4	VH CDR3	DRNSHFDY
184.	MS_4	VL CDR1	RASQGINTWLA
185.	MS_4	VL CDR2	GASGLQS
186.	MS_4	VL CDR3	QQAQKSFPT
187.	MS_4	VH	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWISYISSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNK NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGLTVTVSS
188.	MS_4	VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGITRWLAWYQQKPKGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTI SLQPEDFATYYCQQAQKSFPTFGQGTKVEIK
189.	MS_4	scFv	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWISYISSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNK NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQGITRWLAWYQQKPKGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAQKSF TFGQGTKVEIK
190.	MS_4	Биспецифическая молекула	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWISYISSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNK NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQGITRWLAWYQQKPKGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAQKSF TFGQGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGLTVTVSSGGGGSGGGG GGGGSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKLTVL
191.	MS_5	VH CDR1	DHYMS
192.	MS_5	VH CDR2	YISSGGIIYYADSVKG
193.	MS_5	VH CDR3	DVGSDFDY
194.	MS_5	VL CDR1	RASQDISRWLA
195.	MS_5	VL CDR2	AASRLQS
196.	MS_5	VL CDR3	QQAQKSFPT
197.	MS_5	VH	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKGLEWFSYISSSGGIIYYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDVGSDFDYWGQGLTVTVSS
198.	MS_5	VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQDISRWLAWYQQKPKGKAPKLLISAASRLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTI SLQPEDFAIYYCQQAQKSFPTFGQGTKVEIK
199.	MS_5	scFv	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKGLEWFSYISSSGGIIYYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDVGSDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQDISRWLAWYQQKPKGKAPKLLISAASRLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFAIYYCQQAQKSF TFGQGTKVEIK
200.	MS_5	Биспецифическая молекула	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKGLEWFSYISSSGGIIYYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDVGSDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQDISRWLAWYQQKPKGKAPKLLISAASRLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFAIYYCQQAQKSF TFGQGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGLTVTVSSGGGGSGGGG GGGGSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKLTVL

201.	MS_6	VH CDR1	DHYMS
202.	MS_6	VH CDR2	YISNMSGSIYYVDSVKG
203.	MS_6	VH CDR3	DVRTAFDY
204.	MS_6	VL CDR1	RASQSIGSWLA
205.	MS_6	VL CDR2	AASSLQS
206.	MS_6	VL CDR3	QQANSFPRT
207.	MS_6	VH	QVQLVESGGGLVQPKGSLRSLCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKGLEWISYISNMSGSIYYVDSVKGRTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVVRTAFDYWGQGLTVTVSS
208.	MS_6	VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQSIGSWLAWYQQKPKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQANSFPRFTFGQGTKVDIK
209.	MS_6	scFv	QVQLVESGGGLVQPKGSLRSLCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKGLEWISYISNMSGSIYYVDSVKGRTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVVRTAFDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQSIGSWLAWYQQKPKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPR FTFGQGTKVDIK
210.	MS_6	Биспецифическая молекула	QVQLVESGGGLVQPKGSLRSLCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKGLEWISYISNMSGSIYYVDSVKGRTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVVRTAFDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQSIGSWLAWYQQKPKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPR FTFGQGTKVDIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPKGSLRSLCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGG GGGSGTVVTVQEPFLTVSPGGTVTLTCGSSGTAVTSGNYPNWWVQKPKGAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGG KAALTLQSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGKTLTVL
211.	MS_7	VH CDR1	SKFMT
212.	MS_7	VH CDR2	VIYSGKTYADSVKG
213.	MS_7	VH CDR3	DSGGWGYFDY
214.	MS_7	VL CDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA
215.	MS_7	VL CDR2	WASTRES
216.	MS_7	VL CDR3	QQYYSTPPT
217.	MS_7	VH	EVQLVESGGGLIQPGSLRSLCAVSGFTVSSKFMTWVRQAPGKLEWVSVIYSGKTYADSVKGRFTISRDNASKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSGGWGYFDYWGQGLTVTVSS
218.	MS_7	VL	DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAQYQQKPKGPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSDT FTLTISLQAEADVAVYYCQQYYSTPPTFGQGTKVEIK
219.	MS_7	scFv	EVQLVESGGGLIQPGSLRSLCAVSGFTVSSKFMTWVRQAPGKLEWVSVIYSGKTYADSVKGRFTISRDNASKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSGGWGYFDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDLSLAVSLGERA TINCKSSQSVLYSSNNKNYLAQYQQKPKGPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSDTFTLTISLQAEADVAVYYCQ QYYSTPPTFGQGTKVEIK
220.	MS_7	Биспецифическая молекула	EVQLVESGGGLIQPGSLRSLCAVSGFTVSSKFMTWVRQAPGKLEWVSVIYSGKTYADSVKGRFTISRDNASKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSGGWGYFDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDLSLAVSLGERA TINCKSSQSVLYSSNNKNYLAQYQQKPKGPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSDTFTLTISLQAEADVAVYYCQ QYYSTPPTFGQGTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPKGSLRSLCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG SGGGSGGGGSGTVVTVQEPFLTVSPGGTVTLTCGSSGTAVTSGNYPNWWVQKPKGAPRGLIGGTFKFLAPGTPARF SGSLGGKAALTLQSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGKTLTVL
221.	MS_8	VH CDR1	SYIWN
222.	MS_8	VH CDR2	RIYYNGNTYYNPSLKS
223.	MS_8	VH CDR3	PKLGIDAFDI
224.	MS_8	VL CDR1	TGSSSNIGAGYDVH
225.	MS_8	VL CDR2	GNSNRPS
226.	MS_8	VL CDR3	QSYDSSLGQV
227.	MS_8	VH	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSISSYYWNWIRQPPGKLEWIGRIYYNGNTYYNPSLKSRTVTSKDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARPKLGIDAFDIWGQGMVTVSS
228.	MS_8	VL	QSVLTQFPFVSQAPGQRTVTSCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNPNRPSGVPDRFSGSGKTSASIA ITGLQAEDEADYCYQSYDSSLGQVFGGKTLTVL
229.	MS_8	scFv	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSISSYYWNWIRQPPGKLEWIGRIYYNGNTYYNPSLKSRTVTSKDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARPKLGIDAFDIWGQGMVTVSSGGGSGGGSGGGGQSVLTQFPFVSQAPGQRTV

			ISCTGSSSNIAGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNRNRFSGVPPDRFSGSKSGTASASLAITGLQAEDEADYYCQSYDS SLSGWVFGGGTKLTVL
230.	MS_8	Биспецифическая молекула	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVTSVGGSSISSYWNWIRQPPGKGLIEWIGRIYYNGNTYVNSPLKSRVTSIGDTSKN QFSLKLSVTAADTAVVYCARPKLIGDAFDIWIQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSSQSVLTQPPFSVSGAPGQRTV ISCTGSSSNIAGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNRNRFSGVPPDRFSGSKSGTASASLAITGLQAEDEADYYCQSYDS SLSGWVFGGGTKLTVLSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLIEWARIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVVYCVRHGNFNGSYISYWAYWQGTQTLVTVSSGGGG GGGGSGGGSTVVTQEPSTLVS PGGTVTLTCSGSTGAVTSGNYFNWVQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSG SLLGKKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
231.	MSLN NM_005823 человека	v1 человек	MALPTARPLGSGCTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANFPNIISSLSRQLLGFPCAIEVSG LSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALFDLFLNPDFAFSGPQACTRFFSRIITKANVDLL PRGAPERQRLPAALACWVGRGSLLEADVRALGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAAALQ GGGPPYGPSTWSVSTMDALRGLLVLGQPIIRSI PQGIVAARQRSSRDP SWRQPERTILRPRFRREVEKTACPS GKKAREIDESLI FYKWELEACVDAALLATQMDRVNAI PFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPEVSIQHLYFLKMS PEDIKWNVTSLKALLEVNKGHEMSQVATLIDRFVKGQGLDKDTLDTLTAIFYPGYLCLSPEELSSVPPSS IWA VRPQDLDTCDPRQLDVLVYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRD PLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDDLTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSSTPCLL VLTVALLLASTLA
232.	MSLN NM_013404 человека	v2 человек	MALPTARPLGSGCTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANFPNIISSLSRQLLGFPCAIEVSG LSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALFDLFLNPDFAFSGPQACTRFFSRIITKANVDLL PRGAPERQRLPAALACWVGRGSLLEADVRALGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAAALQ GGGPPYGPSTWSVSTMDALRGLLVLGQPIIRSI PQGIVAARQRSSRDP SWRQPERTILRPRFRREVEKTACPS GKKAREIDESLI FYKWELEACVDAALLATQMDRVNAI PFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPEVSIQHLYFLKMS PEDIKWNVTSLKALLEVNKGHEMSQVATLIDRFVKGQGLDKDTLDTLTAIFYPGYLCLSPEELSSVPPSS LSSVPPSSIWA VRPQDLDTCDPRQLDVLVYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFM KLRDVA VLPTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDDLTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSST PCLLGPVLTVALLLASTLA
233.	MSLN AY743922 человека	v6 человек	MALPTARPLGSGCTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANFPNIISSLSRQLLGFPCAIEVSG LSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALFDLFLNPDFAFSGPQACTRFFSRIITKANVDLL PRGAPERQRLPAALACWVGRGSLLEADVRALGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAAALQ GGGPPYGPSTWSVSTMDALRGLLVLGQPIIRSI PQGIVAARQRSSRDP SWRQPERTILRPRFRREVEKTACPS GKKAREIDESLI FYKWELEACVDAALLATQMDRVNAI PFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPEVSIQHLYFLKMS PEDIKWNVTSLKALLEVNKGHEMSQVATLIDRFVKGQGLDKDTLDTLTAIFYPGYLCLSPEELSSVPPSS IWA VRPQDLDTCDPRQLDVLVYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRD PLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDDLTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSVQEALSSTPCLLGP VLTVALLLASTLA
234.	MSLN C52457 яванца	v1 LMR макак	MALPMARPLGSGCTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRVLAGETRQEAAPLDGITNAPDIASLSRQLLGFCTCEVSG LSTELVQELAVLQKNVKLSAEQLRCLAHRLSEPPEDLDALFDLFLNPDFAFSGPQACTRFFSRIITKANVDLL PRGAPERQRLPAALACWVGRGSLLEADVRALGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVRCGLDQDQQAARAAALQ RGGPPYGPSTWSISTLDDLQSLFLVLGQPVHISI PQGILAAWRQRSSRDP SWQPEQTVLRRFRFRDVERTTCCP EKEVHEIDENLI FYKRELEACVDAALLAAQMDRVDAI PFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPEVSIQHLGHLFLKMS PEDIKWNVTSLKALKLVSKGHEMSAQVATLIDRVVVGQGLDKDTADTLTAFPCGCLCSLSPERLSSVPPSV IGAVRPQDLDTCDPRQLDVLVYPKARLAFQNMNGSEYFVKIRPFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRREAVL PLTVAEVQKLLGPHVEGLKVEEQHSFVRDWILKQRQDDDLTLGLGLQGGIPNGYILDLDSVREALSSTPCLLGP VLTVALLLASTLA
235.	Потенцирующий менакариниты фактор NM_005823	человек	MALPTARPLGSGCTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANFPNIISSLSRQLLGFPCAIEVSG LSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALFDLFLNPDFAFSGPQACTRFFSRIITKANVDLL PRGAPERQRLPAALACWVGRGSLLEADVRALGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAAALQ GGGPPYGPSTWSVSTMDALRGLLVLGQPIIRSI PQGIVAARQRSSRDP SWRQPERTILRPRFRREVEKTACPS
236.	МЭЛН (MSLN), расцепленная форма NM_005823	человек	EVEKTACPSGKKAREIDESLI FYKWELEACVDAALLATQMDRVNAI PFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPEVSIQH LGYLFLKMSPEDIKWNVTSLKALLEVNKGHEMSQVATLIDRFVKGQGLDKDTLDTLTAIFYPGYLCLSPE ELSSVPPSSIWA VRPQDLDTCDPRQLDVLVYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATF MKLRDVA VLPTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDDLTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALS
237.	C-концевое расщепление NM_005823	человек	GTPCLLGPVLTVALLLASTLA

238.	MSLN-E 1	человек	EVEKTACPSGKKAREIDESLI FYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTY
239.	MSLN-E 2	человек	EQLDVLKHKLEDELYPQGYPEVSIQHLGYLFLKMSPEDI
240.	MSLN-E 3	человек	RKWNVTSELETLKALLEVNGHEMSPQVATLIDRFVKGGRQLDKDTLDTLTAIFYPGYLCLSPEELSSVP
241.	MSLN-E 4	человек	PSSIWAVRPQLDTCDFRQLDVLVYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLG
242.	MSLN-E 5	человек	GAPTEDEKALSQQNVSMDLATFMKLRDVAVLPTVAEVQKLLGP
243.	MSLN-E 6	человек	HVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLGGIPNGYLVLDLSMQEAL
244.	MSLN-E 1+2	человек	EVEKTACPSGKKAREIDESLI FYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLEDELYPQGYPEVSIQH LGYLFLKMSPEDI
245.	MSLN-E 2+3	человек	EQLDVLKHKLEDELYPQGYPEVSIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSELETLKALLEVNGHEMSPQVATLIDRFVKGGR QLDKDTLDTLTAIFYPGYLCLSPEELSSVP
246.	hu orl MSLN- E1 mu	искусственный	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANPPNIISSLSRQLLGFPCAIEVSG LSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQRLCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRI TKANVDLL PRGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGLDQDQQAARAAALQ GGGPPYGPSTWSVSTMDALRGLLVLVGPPIIRSI PQGI VAAWRQSRSDPSWRQPPTIIRPRFRRAEAKACP GKEPYKVEDLIFYQNWLEACVDGTMARQMDLVNEIPFTYEQLDVLKHKLEDELYPQGYPEVSIQHLGYLFLKMS PEDIKWNVTSELETLKALLEVNGHEMSPQVATLIDRFVKGGRQLDKDTLDTLTAIFYPGYLCLSPEELSSVPPSS IWAVERPQLDTCDFRQLDVLVYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDEKALSQQNVSMDLATFMKLRDVAVL PLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPF VLTVALLLASTLA
247.	hu orl MSLN- E2 mu	искусственный	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANPPNIISSLSRQLLGFPCAIEVSG LSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQRLCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRI TKANVDLL PRGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGLDQDQQAARAAALQ GGGPPYGPSTWSVSTMDALRGLLVLVGPPIIRSI PQGI VAAWRQSRSDPSWRQPPTIIRPRFRREVEKTACPS GKKAREIDESLI FYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLSIFKHKDKTYPQGYPEVSIQHLGHFFRYVS PEDIKWNVTSELETLKALLEVNGHEMSPQVATLIDRFVKGGRQLDKDTLDTLTAIFYPGYLCLSPEELSSVPPSS IWAVERPQLDTCDFRQLDVLVYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDEKALSQQNVSMDLATFMKLRDVAVL PLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPF VLTVALLLASTLA
248.	hu orl MSLN- E3 mu	искусственный	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANPPNIISSLSRQLLGFPCAIEVSG LSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQRLCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRI TKANVDLL PRGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGLDQDQQAARAAALQ GGGPPYGPSTWSVSTMDALRGLLVLVGPPIIRSI PQGI VAAWRQSRSDPSWRQPPTIIRPRFRREVEKTACPS GKKAREIDESLI FYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLEDELYPQGYPEVSIQHLGYLFLKMS PEDIHQNVTPDVTKLLKVSQKQKMAQAIALVACYLRRGGGLDEDMVKALGDIPLSYLDCDFSPQDLHVSVPSS IWAVERPQLDTCDFRQLDVLVYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDEKALSQQNVSMDLATFMKLRDVAVL PLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPF VLTVALLLASTLA
249.	hu orl MSLN- E4 mu	искусственный	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANPPNIISSLSRQLLGFPCAIEVSG LSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQRLCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRI TKANVDLL PRGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGLDQDQQAARAAALQ GGGPPYGPSTWSVSTMDALRGLLVLVGPPIIRSI PQGI VAAWRQSRSDPSWRQPPTIIRPRFRREVEKTACPS GKKAREIDESLI FYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLEDELYPQGYPEVSIQHLGYLFLKMS PEDIKWNVTSELETLKALLEVNGHEMSPQVATLIDRFVKGGRQLDKDTLDTLTAIFYPGYLCLSPEELSSVPPSSV MWLVGPQDLKCSQRHLGLLYQKACSAFQNVSGLEYFEKIKTFLGGAPTEDEKALSQQNVSMDLATFMKLRDVAVL PLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPF VLTVALLLASTLA
250.	hu orl MSLN- E5 mu	искусственный	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANPPNIISSLSRQLLGFPCAIEVSG LSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQRLCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRI TKANVDLL PRGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGLDQDQQAARAAALQ GGGPPYGPSTWSVSTMDALRGLLVLVGPPIIRSI PQGI VAAWRQSRSDPSWRQPPTIIRPRFRREVEKTACPS GKKAREIDESLI FYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLEDELYPQGYPEVSIQHLGYLFLKMS PEDIKWNVTSELETLKALLEVNGHEMSPQVATLIDRFVKGGRQLDKDTLDTLTAIFYPGYLCLSPEELSSVPPSS IWAVERPQLDTCDFRQLDVLVYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGASVKDLRALSQHNVSMDIATFKRLQVDSL GLSVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPF VLTVALLLASTLA
251.	hu orl MSLN-	искусственный	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANPPNIISSLSRQLLGFPCAIEVSG

	E6 mu		LSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQRLCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRIITKANVDLL PRGAPERQRLPAALACWVGRSLLSEADVRALGGLACDLPGRFVAESAELLPLRLVSCPGPLDQDQQAARAALQ GGGPPYGPSTWSVSTMDALRGLPVLGQPIIRSI PQGIVAARQRSSRSDPSWRQPRTILRPRFRREVEKTACPS GKKAREIDESLI FYKWELEACVDAALLATQMDRVNAI PFTYEQLDVLKHKLELYPQGYPESVIQHLGVLFLKMS PEDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSQVATLIDRFVKGGRQDKDLDLDTAFYFPGYLCSLSPHEELSSVPPSS IWAVRPQDLDTCDPRQLDVLVYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRDVAVL PLTVAEVQKLLGPNIVDLKTEEDKSPVRDWFQRHQKDLDRGLGLQGGIPNGYLVLDNFVREAFSGTPCLLGPGP VLTVLALLASTLA
252.	Fc мономер-1 +c/-g		DKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
253.	Fc мономер-2 +c/-g/delGK		DKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
254.	Fc мономер-3 -c/+g		DKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
255.	Fc мономер-4 -c/+g/delGK		DKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
256.	Fc мономер-5 -c/-g		DKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
257.	Fc мономер-6 -c/-g/delGK		DKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
258.	Fc мономер-7 +c/+g		DKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
259.	Fc мономер-8 +c/+g/delGK		DKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
260.	scFc-1		DKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSH HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQ REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
261.	scFc-2		DKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
262.	scFc-3		DKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSH HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQ REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
263.	scFc-4		DKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG



			GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSP
264.	scFc-5		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGKG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPRE REDQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGK
265.	scFc-6		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGGG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSP
266.	scFc-7		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGGG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPRE REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGK
267.	scFc-8		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGGG
			GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSP
268.	MS_lxCD3-scFc	Биспецифическая молекула HLE	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYGWIRQPPGKLEWIGSIYYSGITNYNPSLKSRTVTSVDT KNQFSLKLSVTAADTAVYYCARPSNYDAFDIWGQGMVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQVSLTQPPSVSAPGQRV TISCTGSSSNI GAGYDVHWYQQVPGTAPKLLIYGNKRPSGVPDRFSGSKSATSASLAITGLQAEDEADYYCYQSYD SSLGGWVFGGKTCLTVLSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLWVARI KYNNAATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYISYWAYWQGTLVTVSSGGG SGGGSGGGGSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARF GSLGGAALTLVSGVQPEDEAEYCYVWYNSRWFVGGGKTLTVLGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKK DTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK FYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGK
269.	MS_lxCD3-scFc_delGK	Биспецифическая молекула HLE	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYGWIRQPPGKLEWIGSIYYSGITNYNPSLKSRTVTSVDT KNQFSLKLSVTAADTAVYYCARPSNYDAFDIWGQGMVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQVSLTQPPSVSAPGQRV TISCTGSSSNI GAGYDVHWYQQVPGTAPKLLIYGNKRPSGVPDRFSGSKSATSASLAITGLQAEDEADYYCYQSYD SSLGGWVFGGKTCLTVLSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLWVARI KYNNAATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYISYWAYWQGTLVTVSSGGG SGGGSGGGGSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARF GSLGGAALTLVSGVQPEDEAEYCYVWYNSRWFVGGGKTLTVLGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKK DTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSD KHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY



		HLE	ITCRASQGISSSLAWYQQKPKAKPLLI DAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFFR TFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGTTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSTVVTQEPSTLTVSPGGTTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDKHTHTCPPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMS RTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSKHTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALDPAIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESENGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
275.	MS_2_CcxCd3- scFc_delGK	Биспецифичес- кая молекула HLE	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSLCAASGFTFSDHYMSWIRQTPGKCLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDLGPSTFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQGISSSLAWYQQKPKAKPLLI DAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFFR TFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGTTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSTVVTQEPSTLTVSPGGTTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDKHTHTCPPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMS RTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSKHTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALDPAIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESENGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
276.	MS_3xCd3-scFc	Биспецифичес- кая молекула HLE	QVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDNRSHFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQGITRWLAWYQQKPKAKPLLIYAASVLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNSFFR TFGQGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGTTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSTVVTQEPSTLTVSPGGTTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDKHTHTCPPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMS RTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSKHTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALDPAIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESENGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
			TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGTTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSTVVTQEPSTLTVSPGGTTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDKHTHTCPPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMS RTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSKHTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALDPAIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESENGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
277.	MS_3xCd3- scFc_delGK	Биспецифичес- кая молекула HLE	QVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDNRSHFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQGITRWLAWYQQKPKAKPLLIYAASVLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNSFFR TFGQGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGTTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSTVVTQEPSTLTVSPGGTTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDKHTHTCPPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMS RTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSKHTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALDPAIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESENGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
278.	MS_3_CcxCd3- scFc	Биспецифичес- кая молекула HLE	QVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDNRSHFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQGITRWLAWYQQKPKAKPLLIYAASVLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNSFFR TFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGTTLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSTVVTQEPSTLTVSPGGTTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPKGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG

			KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLVLGGGGDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP PIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK
279.	MS_3_CCxCD3- scFc_deIGK	Биспецифичес- кая молекула HLE	QVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKCLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDNRNSHFYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQGITRWLAWYQQKPKGKAPKLLIYAASVLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCCQNSGFP TFGCCTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRVQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGNGFNYSIYWAYWQGLTVTVSSGGGSGGGGSG GGGSGQTVVTEPESLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGTKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLVLGGGGDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK
280.	MS_4xCD3-scFc	Биспецифичес- кая молекула HLE	QVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDNRNSHFYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQGITRWLAWYQQKPKGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCCQAKSFP TFGCCTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRVQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGNGFNYSIYWAYWQGLTVTVSSGGGSGGGGSG GGGSGQTVVTEPESLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGTKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLVLGGGGDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK
			PIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK
281.	MS_4xCD3- scFc_deIGK	Биспецифичес- кая молекула HLE	QVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDNRNSHFYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQGITRWLAWYQQKPKGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCCQAKSFP TFGCCTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRVQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGNGFNYSIYWAYWQGLTVTVSSGGGSGGGGSG GGGSGQTVVTEPESLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGTKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLVLGGGGDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK
282.	MS_4_CCxCD3- scFc	Биспецифичес- кая молекула HLE	QVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKCLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDNRNSHFYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQGITRWLAWYQQKPKGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCCQAKSFP TFGCCTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRVQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGNGFNYSIYWAYWQGLTVTVSSGGGSGGGGSG GGGSGQTVVTEPESLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGTKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLVLGGGGDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK

			CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
283.	MS_4_CcxCd3- scFc_de1GK	Биспецифичес- кая молекула HLE	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDYMTWIRQAPGKCLEWLSYISSSGGTIYYADSVKGRFTISRDNK NSLFLQMNSLRAEDTAVYICARDRNHFYDYGQGLTIVTSSGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQGINTLAWYQQKPKGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAQKSFPR TFGCCTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNMLKTEDTAVYICVRHGNFGNSYISYWAYWQGLTIVTSSGGGSGGGG GGGSGTIVTQEPSTLTVSPGGTIVLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI S RTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCS SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
284.	MS_5xCd3-scFc	Биспецифичес- кая молекула HLE	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKLEWFSYISSSGGIYYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYICARDVGSDFDYWGQGLTIVTSSGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQDISRWLAWYQQKPKGKAPKLLISAASRLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFAIYYCQQAQKSFPR TFGQCTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNMLKTEDTAVYICVRHGNFGNSYISYWAYWQGLTIVTSSGGGSGGGG GGGSGTIVTQEPSTLTVSPGGTIVLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI S RTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSKTHT CPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
285.	MS_5xCd3- scFc_de1GK	Биспецифичес- кая молекула HLE	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKLEWFSYISSSGGIYYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYICARDVGSDFDYWGQGLTIVTSSGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQDISRWLAWYQQKPKGKAPKLLISAASRLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFAIYYCQQAQKSFPR TFGQCTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNMLKTEDTAVYICVRHGNFGNSYISYWAYWQGLTIVTSSGGGSGGGG GGGSGTIVTQEPSTLTVSPGGTIVLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI S RTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCS SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
286.	MS_5_CcxCd3- scFc	Биспецифичес- кая молекула HLE	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKCLEWFSYISSSGGIYYADSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYICARDVGSDFDYWGQGLTIVTSSGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQDISRWLAWYQQKPKGKAPKLLISAASRLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFAIYYCQQAQKSFPR TFGCCTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNMLKTEDTAVYICVRHGNFGNSYISYWAYWQGLTIVTSSGGGSGGGG GGGSGTIVTQEPSTLTVSPGGTIVLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI S RTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSYRCS SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
287.	MS_5_CcxCd3-	Биспецифичес-	QVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKCLEWFSYISSSGGIYYADSVKGRFTISRDNK

	scFc_delGK	какая молекула HLE	NSLYLQMNSLRAEDTAVYVCARDVGSHFYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQTQSPSSVSASVGDVRT ITCRASQDISRWLAWYQKPKGKAPKLLISAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAIYYCQAKSFPFR TFGCCTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNNLKTEDTAVYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGLTVTVSSGGGGSGGGG GGGGQTVVTVQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI RTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCV SVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
288.	MS_6xCD3-scFc	Биспецифическая молекула HLE	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKLEWISYISNSGSIYYVDSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYVCARDVRTAFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQTQSPSSVSASVGDVRT ITCRASQSIGSWLAWYQKPKGKAPNLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQANSFPFR TFGCCTKVDIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNNLKTEDTAVYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGLTVTVSSGGGGSGGGG GGGGQTVVTVQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI RTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR CVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
289.	MS_6xCD3-scFc_delGK	Биспецифическая молекула HLE	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKLEWISYISNSGSIYYVDSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYVCARDVRTAFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQTQSPSSVSASVGDVRT ITCRASQSIGSWLAWYQKPKGKAPNLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQANSFPFR TFGCCTKVDIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNNLKTEDTAVYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGLTVTVSSGGGGSGGGG GGGGQTVVTVQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI RTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR CVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
			TFGCCTKVDIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNNLKTEDTAVYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGLTVTVSSGGGGSGGGG GGGGQTVVTVQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI RTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR CVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
290.	MS_6_CcxCD3-scFc	Биспецифическая молекула HLE	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKLEWISYISNSGSIYYVDSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYVCARDVRTAFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQTQSPSSVSASVGDVRT ITCRASQSIGSWLAWYQKPKGKAPNLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQANSFPFR TFGCCTKVDIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNNLKTEDTAVYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGLTVTVSSGGGGSGGGG GGGGQTVVTVQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI RTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR CVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
291.	MS_6_CcxCD3-scFc_delGK	Биспецифическая молекула HLE	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKLEWISYISNSGSIYYVDSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYVCARDVRTAFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQTQSPSSVSASVGDVRT ITCRASQSIGSWLAWYQKPKGKAPNLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQANSFPFR TFGCCTKVDIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNNLKTEDTAVYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGLTVTVSSGGGGSGGGG GGGGQTVVTVQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI RTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR CVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

			GGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMS RTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP PIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGDKHTC PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRC SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
292.	MS_7xCD3-scFc	Биспецифическая молекула HLE	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAVSGFTVSSKFMWVRQAPGKLEWVSVIYSGGKTYADSVKGRFTISRDN TLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDSSGGWGYFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSDI VMTQSPD SLAVSLGERA TINCKSSQSVLYSSNNKNLAWYQQKFGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGGSDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQ QYYSTPPTFGCGTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY AMNWRQAPGKLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGG S KDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGG S GSDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPCEE QYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCSCVM HEALHNHYTQKSLSLSPG K
293.	MS_7xCD3-scFc_delGK	Биспецифическая молекула HLE	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAVSGFTVSSKFMWVRQAPGKLEWVSVIYSGGKTYADSVKGRFTISRDN TLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDSSGGWGYFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSDI VMTQSPD SLAVSLGERA TINCKSSQSVLYSSNNKNLAWYQQKFGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGGSDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQ QYYSTPPTFGCGTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY AMNWRQAPGKLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGG S KDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGG S GSDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPCEE QYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCSCVM HEALHNHYTQKSLSLSPG K
			SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPK KDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGG S GSDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPCEE QYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCSCVM HEALHNHYTQKSLSLSPG K
294.	MS_7_CCxCD3-scFc	Биспецифическая молекула HLE	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAVSGFTVSSKFMWVRQAPGKLEWVSVIYSGGKTYADSVKGRFTISRDN TLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDSSGGWGYFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSDI VMTQSPD SLAVSLGERA TINCKSSQSVLYSSNNKNLAWYQQKFGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGGSDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQ QYYSTPPTFGCGTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY AMNWRQAPGKLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGG S KDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGG S GSDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPCEE QYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCSCVM HEALHNHYTQKSLSLSPG K
295.	MS_7_CCxCD3-scFc_delGK	Биспецифическая молекула HLE	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAVSGFTVSSKFMWVRQAPGKLEWVSVIYSGGKTYADSVKGRFTISRDN TLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDSSGGWGYFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSDI VMTQSPD SLAVSLGERA TINCKSSQSVLYSSNNKNLAWYQQKFGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGGSDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQ QYYSTPPTFGCGTKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY AMNWRQAPGKLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGG S KDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKV SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGG S GSDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPCEE QYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQGNVFCSCVM HEALHNHYTQKSLSLSPG K





## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическая конструкция, связывающаяся с CD3 и мезотелином (MSLN), содержащая первый связывающий домен, который связывается с MSLN человека на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, причем первый связывающий домен связывается с эпитопом MSLN, находящимся в пределах участка, представленного SEQ ID NO: 245, где

первый связывающий домен содержит участок VH, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и участок VL, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из:

а) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 161, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 162, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 163, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 164, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 165 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 166;

б) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 171, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 172, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 173, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 174, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 175 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 176;

в) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 181, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 182, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 183, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 184, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 185 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 186;

д) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 191, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 192, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 193, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 194, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 195 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 196; и

е) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 201, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 202, CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 203, CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 204, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 205 и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 206;

где второй связывающий домен содержит участок VH и участок VL, где участок VH содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, выбранные из:

(а) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 14, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 15, и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 16;

(б) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 23, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 24, и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 25;

(в) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 32, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 33, и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 34;

(г) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 41, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 42, и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 43;

(д) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 50, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 51, и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 52;

(е) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 59, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 60, и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 61;

(ж) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 68, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 69, и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 70;

(з) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 77, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 78, и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 79;

(и) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 86, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 87, и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 89; и

(к) CDR-H1, представленного в SEQ ID NO: 95, CDR-H2, представленного в SEQ ID NO: 96, и CDR-H3, представленного в SEQ ID NO: 97;

и участок VL содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из:

(а) CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 20, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 21, и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 22;

(б) CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 65, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 66, и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 67; и

(в) CDR-L1, представленного в SEQ ID NO: 92, CDR-L2, представленного в SEQ ID NO: 93, и CDR-L3, представленного в SEQ ID NO: 94.

2. Конструкция по п.1, в которой первый связывающий домен также связывается с MSLN макаки.

3. Конструкция по п.1 или 2, в которой второй связывающий домен связывается с CD3 эпислон человека и с CD3 эпислон *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* или *Saimiri sciureus*.

4. Конструкция по любому из предшествующих пунктов, в которой конструкция находится в формате, выбранном из группы, состоящей из (scFv)<sub>2</sub>, scFv-однодоменного mAb, диател и олигомеров указанных форматов.

5. Конструкция по любому из предшествующих пунктов, в которой первый связывающий домен содержит участок VH, выбранный из группы, состоящей из представленных в SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 197 и SEQ ID NO: 207.

6. Конструкция по любому из предшествующих пунктов, в которой первый связывающий домен содержит участок VL, выбранный из группы, состоящей из представленных в SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 198 и SEQ ID NO: 208.

7. Конструкция по любому из предшествующих пунктов, где первый связывающий домен содержит участок VH и участок VL, выбранные из группы, состоящей из пар участка VH и участка VL, представленных в SEQ ID NO: 167 и 168, SEQ ID NO: 177 и 178, SEQ ID NO: 187 и 188, SEQ ID NO: 197 и 198 и SEQ ID NO: 207 и 208.

8. Конструкция по любому из предшествующих пунктов, в которой первый связывающий домен содержит полипептид, выбранный из группы, состоящей из представленных в SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 199 и SEQ ID NO: 209.

9. Конструкция по любому из предшествующих пунктов, содержащая:

(a) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 199 и SEQ ID NO: 209;

пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-9; и

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 103;

(b) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 199 и SEQ ID NO: 209;

пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-9;

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 103;

дополнительно полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 104-134;

(c) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

дополнительный полипептид, имеющий аминокислотную последовательность QRFVTGHFG-GLX<sub>1</sub>PANG (SEQ ID NO: 135), где X<sub>1</sub> представляет собой Y или H; и

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 199 и SEQ ID NO: 209;

пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-9;

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 103;

дополнительный полипептид, имеющий аминокислотную последовательность QRFVTGHFGGLH-PANG (SEQ ID NO: 137) или QRFCTGHFGGLHPCNG (SEQ ID NO: 139);

(d) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 101;

пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8;

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 198 и SEQ ID NO: 208, и остаток серина на C-конце;

дополнительно полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 140; и

полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 197 и SEQ ID NO: 207;

пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8;

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 99 и SEQ ID NO: 102, и остаток серина на C-конце;

дополнительно полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 141;

(e) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из



пы, состоящей из SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 199 и SEQ ID NO: 209; пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8 и 9;

второй связывающий домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 103;

пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 8 и 9; и

третий домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 260-267.

11. Конструкция по п.10, содержащая последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: от 276 до 287.

12. Конструкция по любому из пп.1-11, в которой соотношение аффинности связывания первого связывающего домена с MSLN макака/MSLN человека (по данным анализа Scatchard) составляет меньше чем 100 или меньше чем 20, или меньше чем 15, или меньше чем 10, или меньше чем 8, или меньше чем 6, или меньше чем 2.

13. Полинуклеотид, кодирующий конструкцию, как определено в любом из предшествующих пунктов.

14. Вектор для переноса, содержащий полинуклеотид, как определено в п.13.

15. Клетка-хозяин для экспрессии конструкции, трансформированная или трансфектированная полинуклеотидом по п.13 или вектором, как определено в п.14.

16. Способ получения конструкции по любому из пп.1-12, включающий культивирование клетки-хозяина по п.15 в условиях, позволяющих экспрессию конструкции по любому из пп.1-12, и выделение продуцированной конструкции из культуры.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию по любому из пп.1-12 или полученную по способу согласно п.16.

18. Применение конструкции по любому из пп.1-12 или полученной по способу по п.16 для профилактики, лечения или облегчения заболевания в форме солидной опухоли или метастатического ракового заболевания, при которых экспрессируется MSLN.

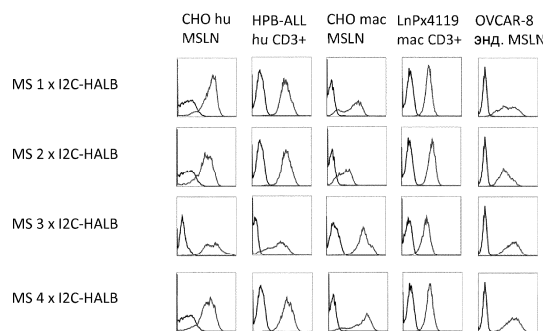
19. Способ лечения или облегчения заболевания в форме солидной опухоли или заболевания в форме метастатического рака, при которых экспрессируется MSLN, включающий стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, конструкции по любому из пп.1-12 или полученной по способу по п.16.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что заболевание в форме солидной опухоли выбрано из группы, состоящей из рака яичников, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, рака легкого, рака желудка и заболевания в форме тройного отрицательного рака молочной железы или метастатического ракового заболевания, происходящего из любого из вышеперечисленного.

21. Фармацевтический набор, содержащий инструкции по применению, отличающийся тем, что указанный набор содержит конструкцию по любому из пп.1-12, конструкцию, полученную по способу по п.16, полинуклеотид по п.13, вектор по п.14 и/или клетку-хозяин по п.15.

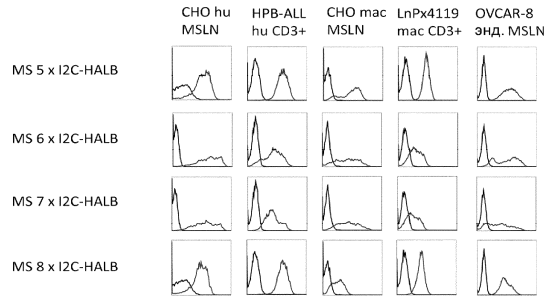


Фиг. 1

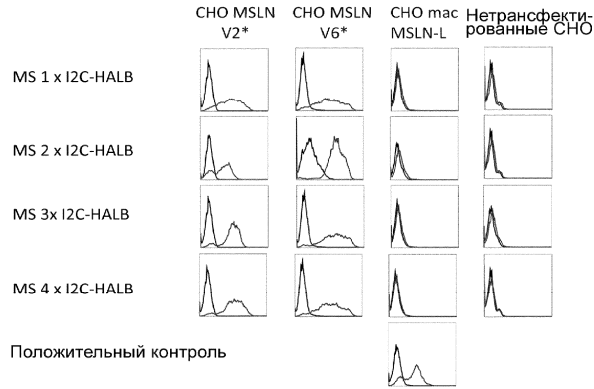


Фиг. 2а

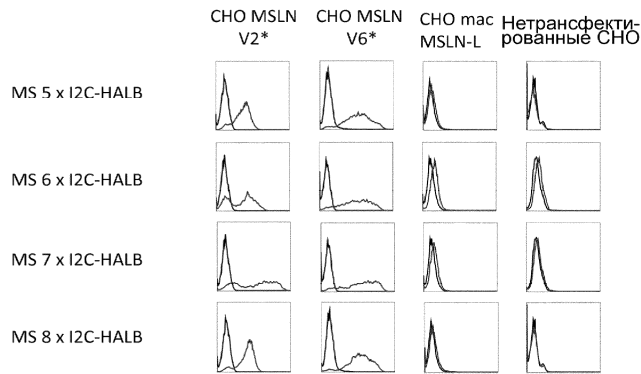
042291



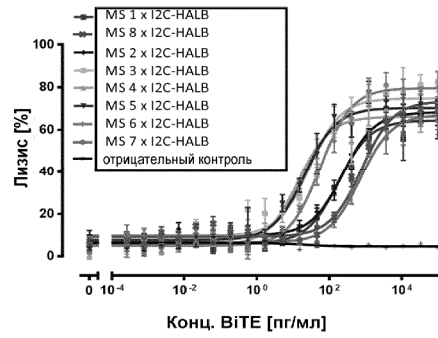
Фиг. 2b



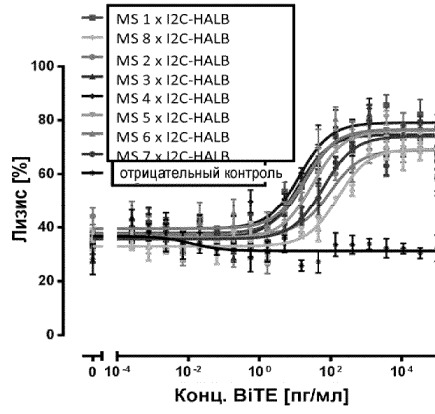
Фиг. 3a



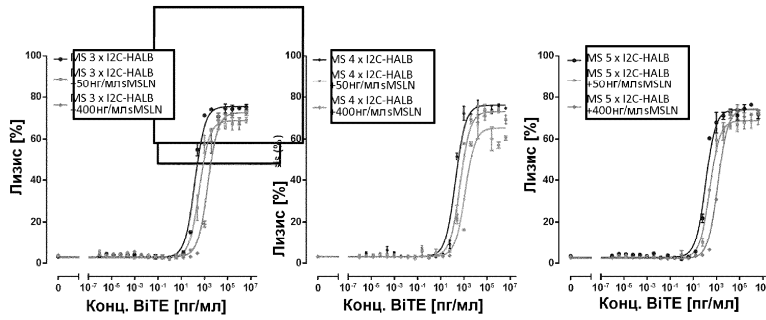
Фиг. 3b



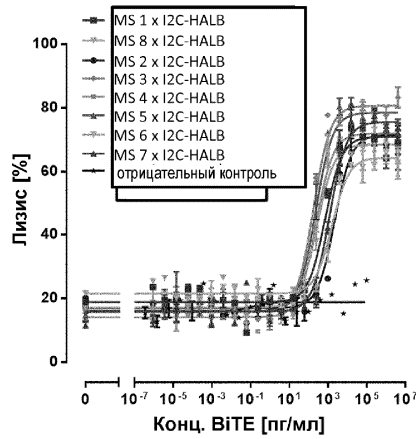
Фиг. 4



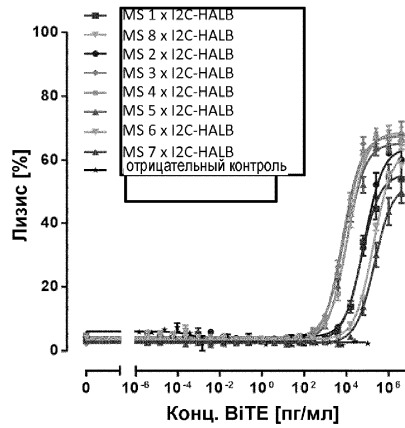
Фиг. 5



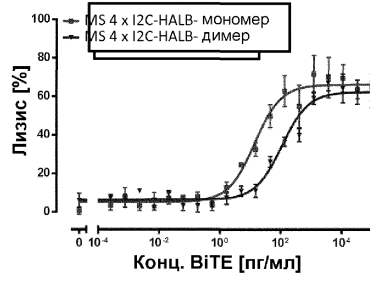
Фиг. 6



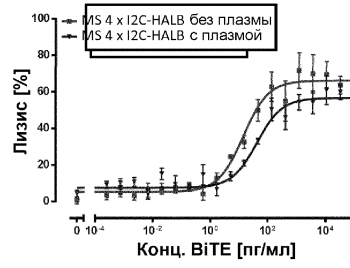
Фиг. 7



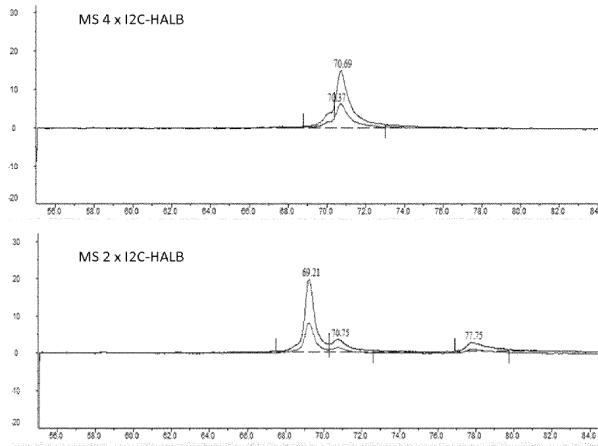
Фиг. 8



Фиг. 9

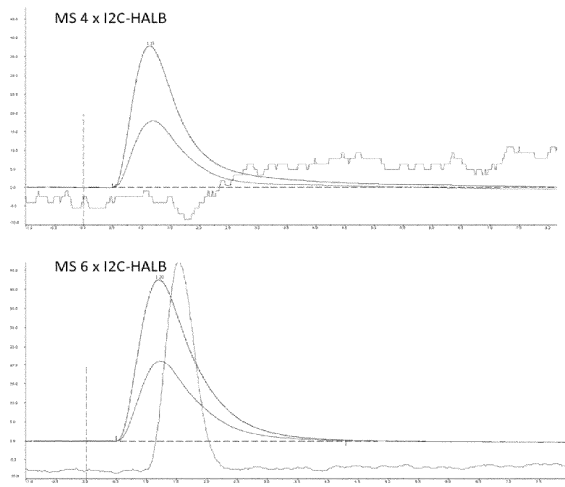


Фиг. 10



Голубая линия = OD280 нм  
Красная линия = OD254 нм

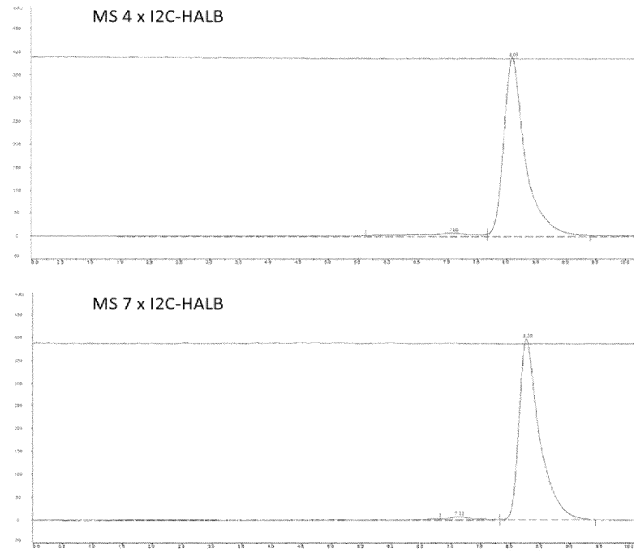
Фиг. 11



Голубая линия = OD280 нм  
Красная линия = OD254 нм

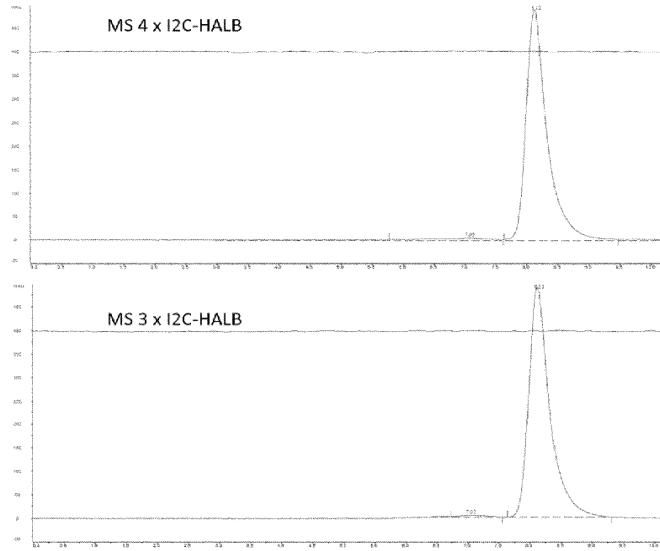
Фиг. 12

042291



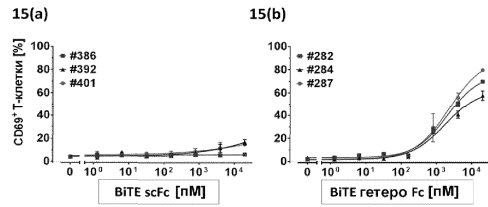
OD210 нм

Фиг. 13

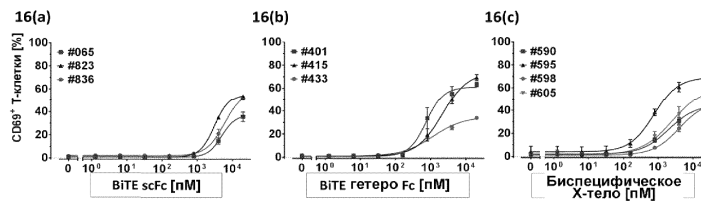


OD210 нм

Фиг. 14

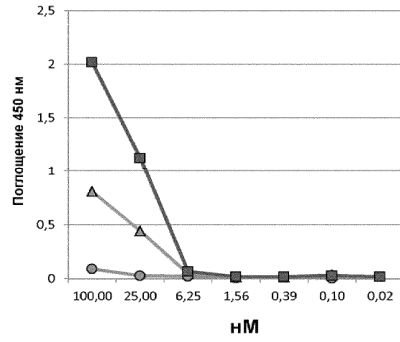


ФИГ. 15

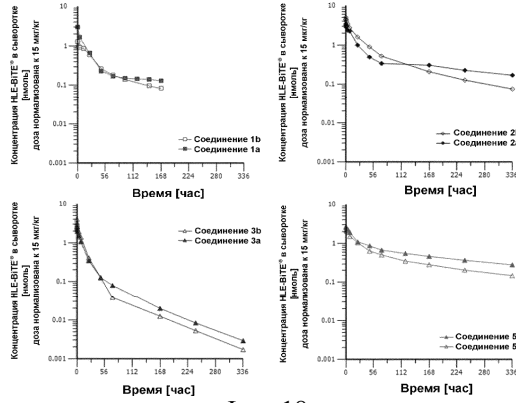


Фиг. 15; 16



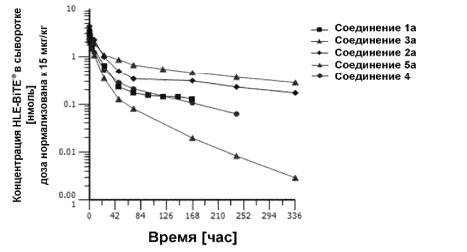


Фиг. 17



Фиг. 18

— ВITE scFc  
 — каноническое ВITE  
 — ВITE гетеро Fc



Фиг. 19

